



*“Caracterización, Clonado y Expresión de Biomoléculas de
Origen Vegetal con Potencial Aplicación en el Desarrollo de
Nuevos Fármacos”*

Laboratorio de Procesos Biotecnológicos.

Licenciatura en Biotecnología y Biología Molecular.

Juliana Cotabarren

Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales, Facultad de Ciencias
Exactas, Universidad Nacional de La Plata

Walter David Obregón

Director

Daniela Lufrano

Codirectora

La Plata, Marzo de 2014

INDICE

1. Introducción.....	6
1.1 Fundamentos de la búsqueda de inhibidores de proteasas.....	7
1.2 Inhibidores de proteasas.....	10
1.2.1 Tipos mecanísticos de inhibidores de proteasas.....	10
1.2.2 Inhibidores de proteasas de origen vegetal.....	10
1.2.3 Inhibidores de metalocarboxipeptidasas.....	11
1.2.3.1 Inhibidores de Carboxipeptidasa A.....	11
1.3 Aplicaciones de los inhibidores de proteasas.....	14
2. Objetivos.....	17
3. Materiales y Métodos.....	18
3.1 Material vegetal.....	19
3.2 Metodología.....	20
3.2.1 Clonado del nuevo PCI.....	20
3.2.1.1 Diseño de cebadores (<i>primers</i>) específicos.....	20
3.2.1.2 Aislamiento del cDNA.....	21
3.2.1.2.1 Extracción del RNA total.....	21
3.2.1.2.2 RACE-PCR.....	22
3.2.1.2.2.1 Reacción de Retrotranscripción (RT).....	22
3.2.1.2.2.2 Reacción de PCR.....	24
3.2.1.3 Electroforesis en geles de agarosa.....	24
3.2.1.3.1 Preparación de las muestras.....	25
3.2.1.3.2 Preparación de los geles.....	25
3.2.1.3.3 Condiciones de corrida.....	26

3.2.1.4 Purificación de fragmentos de DNA.....	26
3.2.1.5 Clonado del cDNA.....	26
3.2.1.5.1 Medios de cultivo utilizados.....	27
3.2.1.5.1.1 Medios de cultivo líquidos.....	27
3.2.1.5.1.2 Medios de cultivo sólidos.....	27
3.2.1.5.1.3 Reactivos adicionales.....	28
3.2.1.5.2 Obtención de células <i>E. coli</i> competentes.....	29
3.2.1.6 Clonación.....	30
3.2.1.6.1 Vector de clonado.....	30
3.2.1.6.2 Ligación.....	31
3.2.1.6.3 Transformación y selección de clones.....	31
3.2.1.6.4 Glicerinado de los clones.....	32
3.2.1.7 Secuenciación del cDNA clonado.....	33
3.2.1.7.1 Aislamiento del DNA plasmídico.....	33
3.2.1.7.2 Digestión con enzimas de restricción.....	33
3.2.1.7.3 Secuenciación del DNA.....	34
3.2.1.7.4 Análisis de las secuencias de los cDNAs.....	34
3.2.2 Expresión del nuevo PCI.....	34
3.2.2.1 Diseño de primers para expresión.....	34
3.2.2.2 Obtención de la construcción de expresión.....	35
3.2.2.2.1 Aislamiento del cDNA del nuevo PCI.....	35
3.2.2.2.2 Clonado del cDNA del nuevo PCI.....	37
3.2.2.2.3 Ligación del cDNA del nuevo PCI al vector de expresión.....	37
3.2.2.3 Clonado en pIN-III-OmpA3.....	38
3.2.2.4 Producción de la proteína recombinante.....	38
3.2.2.4.1 Medios de cultivo utilizados.....	38

3.2.2.4.1.1 Medios de cultivo líquidos.....	38
3.2.2.4.2 Expresión en E. coli.....	39
3.2.2.4.3 Reordenamiento de los puentes disulfuro.....	39
3.2.2.4.4 Clarificación y centrifugado.....	40
3.2.3 Purificación del nuevo PCI.....	40
3.2.3.1 Cromatografía de intercambio iónico.....	40
3.2.3.2 Cromatografía en fase reversa a presión normal.....	40
3.2.3.3 Cromatografía en fase reversa a alta presión.....	41
3.2.4 Caracterización del nuevo PCI.....	41
3.2.4.1 Actividad inhibitoria de Carboxipeptidasa A.....	41
3.2.4.2 Caracterización proteómica.....	41
3.2.4.2.1 Determinación del peso molecular por MALDI-TOF.....	41
3.2.4.2.2 PMF MALDI-TOF.....	42
3.2.4.2.2.1 Electroforesis SDS-PAGE.....	42
3.2.4.2.2.1.1 Preparación de las muestras.....	42
3.2.4.2.2.1.2 Preparación de los geles.....	43
3.2.4.2.2.1.3 Aplicación de muestras y condiciones de corrida.....	44
3.2.4.2.2.1.4 Fijación y tinción.....	45
3.2.4.2.2.2 Digestión trípica.....	45
3.2.4.2.2.3 Determinación de la huella peptídica.....	46
3.2.4.2.3 PMF MALDI-TOF/TOF.....	46
4. Resultados y Discusión.....	48
4.1 Clonado y secuenciamiento del nuevo PCI.....	49
4.1.1 Aislamiento del cDNA.....	49
4.1.2 Clonado del cDNA del nuevo preproPCla parcial.....	50
4.1.3 Análisis de secuencia.....	51

4.1.3.1 Análisis de la secuencia nucleotídica.....	53
4.1.3.2 Análisis de la secuencia aminoacídica.....	54
4.2 Expresión del nuevo PCI.....	55
4.2.1 Aislamiento del cDNA del PCIa.....	55
4.2.2 Expresión de la proteína recombinante.....	57
4.3 Purificación del nuevo PCI.....	59
4.3.1 Cromatografía de intercambio iónico.....	59
4.3.2 Cromatografía en fase reversa a presión normal.....	60
4.4 Caracterización del nuevo PCI.....	61
4.4.1 Actividad inhibitoria de Carboxipeptidasa A.....	61
4.4.2 Caracterización proteómica.....	62
4.4.2.1 Determinación de peso molecular por MALDI-TOF.....	62
4.4.2.2 PMF MALDI-TOF.....	63
4.4.2.3 PMF MALDI-TOF/TOF.....	64
5. Conclusiones.....	66
6. Perspectivas a Futuro.....	68
7. Bibliografía.....	69

INTRODUCCIÓN



1.1 Fundamentos de la búsqueda de inhibidores de proteasas

Productos naturales, proteasas e inhibidores de proteasas:

“Debido a su gran diversidad química y a que se les supone una toxicidad inicial limitada al encontrarse originalmente en seres vivos, los productos naturales, también denominadas biomoléculas, constituyen una de las mayores fuentes de compuestos usados como materia prima para el desarrollo de medicamentos”.

“Dentro de estos productos podemos citar a moléculas muy pequeñas que cumplen un rol importante en la fisiología de los organismos vivos, ellos cumplen una acción crucial en la regulación de muchos procesos bioquímicos regulados por proteasas, más específicamente aún, son sustancias moduladoras de la actividad proteolítica, y se conoce a estas biomoléculas como Inhibidores de Proteasas (IPs)”.

Durante las últimas décadas las investigaciones biomédicas han revelado que las proteasas juegan un rol crucial en diversos procesos patológicos. De esta manera, la regulación de sus actividades mediante el uso de inhibidores de proteasas (IPs) constituye un abordaje terapéutico muy interesante en el tratamiento de varias enfermedades humanas de gravedad tales como cáncer, infecciones parasitarias, fúngicas y virales, así como también afecciones inflamatorias, inmunológicas, respiratorias, cardiovasculares y Alzheimer, lo que representa en la actualidad, la principal aplicación de esta clase de sustancias.

Los IPs tradicionalmente estudiados se han desarrollado a partir de *screening* en fuentes naturales ya que los procedimientos de obtención por esta vía son en general menos costosos y relativamente sencillos, comparados con los procedimientos de obtención de inhibidores por la vía de la síntesis química. Además, se ha demostrado que los inhibidores naturales presentan una mayor diversidad química, inocuidad, elevada potencia, especificidad y menor carácter hidrofóbico.

Sin embargo, a pesar de eso y de la ventaja de su extraordinaria riqueza y diversidad y, en muchos casos, de la inexistencia de patentes que dificulten

su explotación, las fuentes vegetales de inhibidores de proteasas han sido escasamente exploradas. Estas sustancias inhibitorias se distribuyen en un amplio espectro de biomoléculas, las cuales desarrollan diversas actividades funcionales que forman parte de los mecanismos de defensa de los vegetales frente a los depredadores.

Por tanto, estas fuentes naturales prometen grandes esperanzas en la obtención de moléculas bioactivas novedosas y efectivas. Los inhibidores de proteasas (IPs) de plantas son estructuras peptídicas pequeñas, generalmente se encuentran en alta concentración en tejidos de almacenamiento (hasta un 10% del contenido total de proteínas), pero también son detectables en hojas en respuesta al ataque de insectos y microorganismos patógenos. Se han descrito IPs de plantas que actúan frente a proteasas de los principales grupos mecanísticos.

Las aplicaciones de los inhibidores de proteasas han estado dirigidas fundamentalmente al área de la salud humana, que constituye hasta ahora su “blanco” principal. La actividad de los IPs obedece a su capacidad de formar complejos estables con las proteasas blanco, bloqueando, alterando o impidiendo el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima y representan una herramienta terapéutica valiosa. Los IPs han sido probados en modelos experimentales y también como agentes terapéuticos en humanos. Los IPs tienen promisorios usos terapéuticos en el tratamiento de enfermedades como cáncer, infecciones parasitarias, fúngicas y virales (esquistosomiasis, malaria, candidiasis, SIDA, hepatitis, herpes), afecciones inflamatorias y respiratorias, cardiovasculares, coagulopatías y desórdenes neurovegetativos, incluida la enfermedad de Alzheimer.

Como ejemplos de IPs de origen vegetal podemos mencionar a las cistatinas de plantas (fitocistatinas) que inhiben proteasas cisteínicas, entre ellas las caspasas, enzimas involucradas en el proceso de apoptosis y por ende en el desarrollo de enfermedades degenerativas y autoinmunes. Se han aislado también inhibidores de metaloproteasas. La regulación de la actividad de dichas enzimas es de importancia, ya que las metaloproteasas de matriz (MMPs) desempeñan un rol central en enfermedades tales como la artritis, el cáncer o la aterosclerosis. Además, a partir de semillas se ha obtenido un gran

número de inhibidores de proteasas serínicas, entre ellos cabe mencionar un inhibidor extraído de semillas de *Leucaena leucocephala* que inhibe plasmina y exhibe propiedades anticoagulantes *in vivo* y el inhibidor de tripsina de tipo Bowman-Birk (BBI) presente en soja que ha demostrado actividad anticancerígena en ensayos clínicos y en ensayos *in vitro*.

Otro ejemplo a destacar es el Inhibidor de Carboxipeptidasa A de Papa (PCI) que inhibe el crecimiento del parásito *Plasmodium falciparum*, causante de malaria. El blanco terapéutico al cual se une el PCI para inhibir el crecimiento del parásito es una metalocarboxipeptidasa de *P. falciparum* conocida como PfNnal. Dicha metalocarboxipeptidasa es un blanco terapéutico muy útil para identificar nuevos compuestos en el tratamiento antimalárico. Otro hallazgo interesante es que el PCI se comporta como un antagonista del EGF (*Epidermal Growth Factor*), y se trata del primer antagonista del EGF humano que ha sido registrado, por lo tanto, podría tratarse de un agente antitumoral putativo.

En el presente plan de trabajo se pretende clonar, expresar en forma recombinante, aislar y caracterizar bioquímicamente nuevos inhibidores de proteasas provenientes de tubérculos de Solanum tuberosum subespecie andigenum (papa andina). El material de partida es conocido por ser una familia rica en este tipo de inhibidores.

Principalmente nos centraremos en la búsqueda de nuevos inhibidores de metalocarboxipeptidasas de origen vegetal que posean potencial aplicación en malaria. Dicho trabajo es parte de un proyecto de Investigación denominado: “Proteómica y quimiogenómica de inhibidores de proteasas de origen natural con potencial terapéutico en malaria”, perteneciente al Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED).

1.2. Inhibidores de proteasas

1.2.1 Distintos tipos mecanísticos de inhibidores de proteasas

De acuerdo al grupo mecanístico de las proteasas sobre las cuales actúa, Los IPs se encuentran divididos en cuatro grandes clases: inhibidores de serín proteasas, inhibidores de cisteín proteasas, inhibidores de aspartil proteasas e inhibidores de metalo proteasas; a excepción de las alfa-2-macroglobulinas que inhiben proteasas de todas las clases. (Hartley *et al.*, 1960).

IPs pertenecientes a dichas clases mecanísticas han sido además clasificados en 48 familias (Rawlings *et al.*, 2004), basadas en homologías en las secuencias aminoacídicas, relaciones topológicas entre los puentes disulfuro y la localización de los sitios reactivos (descriptos previamente por Laskowski y Kato, 1980).

1.2.2 Inhibidores de proteasas de origen vegetal:

En las plantas, los inhibidores de proteasas se encuentran generalmente tanto como componentes constitutivos en tejidos de almacenamiento como semillas y tubérculos o expresadas en respuesta a pestes o a ataques patógenos en el resto de los tejidos (Ryan, 1990).

En general los IPs de plantas presentan una masa molecular entre 4 y 85 kDa, aunque la mayoría están en el rango de 8 a 20 kDa (Ryan, 1990, Hung *et al.*, 2003). Estos inhibidores tienen usualmente un alto contenido de residuos cisteínas que forman puentes disulfuro, lo cual los hace resistentes al calor, a pHs extremos y a la proteólisis (Richardson, 1991; Greenblatt *et al.*, 1989; Fan y Xu, 2005). Por ejemplo, el inhibidor de tripsina de tipo Bowman–Birk purificado de semillas de *Brassica campestris* (BCTI) de peso molecular 8 kDa, que inhibe la tripsina en una proporción molar de 1:1, presenta una termoestabilidad aparentemente relacionada con la presencia de puentes disulfuro (Hung *et al.*, 2003).

En semillas, los IPs mantienen procesos fisiológicos como la regulación de los niveles de proteasas endógenas (Chye *et al.*, 2006), proteínas de almacenamiento (Mandal *et al.*, 2002), estabilización de las enzimas durante la fase de desecación (Lam *et al.*, 1999) y protección frente a pestes (Haq *et al.*,

2004) y microorganismos invasivos (Mosolov y Valueva, 2006). Los IPs también colaboran en la regulación de la muerte celular programada.

Los IPs son pequeñas proteínas regulatorias, que en las plantas se encuentran generalmente en alta concentración, representando entre el 1% y más del 10 % del total de las proteínas solubles. Los IPs se presentan en prácticamente todas las leguminosas, particularmente la soja, que contiene inhibidores de tipo Kunitz y Bowman-Birk (Whitaker, J. R., 1997).

1.2.3. Inhibidores de metalocarboxipeptidasas

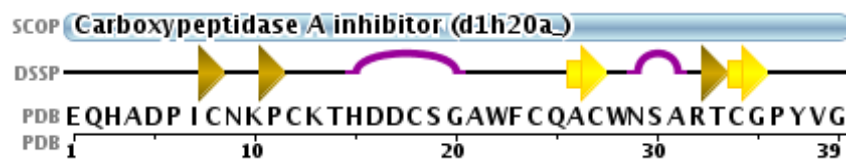
A diferencia de la amplia distribución en la naturaleza con la que se presentan la mayoría de los inhibidores de endopeptidasas, los inhibidores naturales de las carboxipeptidasas pancreáticas, se han purificado solamente a partir de tubérculos de papa (Rancour JM, CA Ryan 1963), parásitos intestinales del hombre intestinales (Homandberg GA, RJ Peanasky 1976) y tomate (Hass GM, CA Ryan 1980). Uno de los mecanismos de inhibición encontrados para un tipo de inhibidor de esta clase se basa en la interacción de su secuencia aminoacídica carboxilo terminal con la ranura del sitio activo de la enzima imitando la unión del sustrato a este sitio (Vendrell, 2000).

1.2.3.1 Inhibidores de carboxipeptidasa A

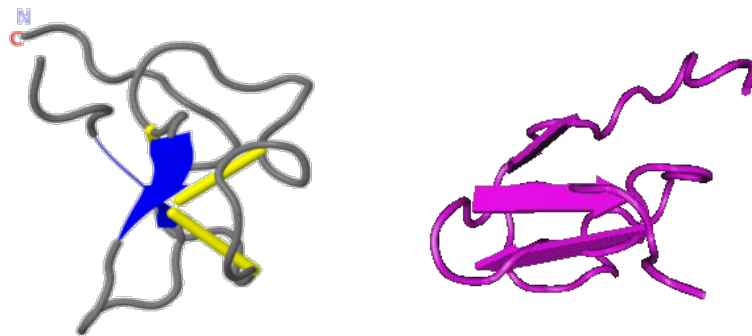
Tal como se mencionó anteriormente, los polipéptidos que inhiben específicamente metalocarboxipeptidasas sólo se han determinado en pocas especies. Hasta el momento fueron hallados en papas, tomates, lombrices, sanguijuelas y en algunos tejidos de mamíferos (Homandberg, 1989; Ryan, 1989; Normant, 1995; Reverter, 1998). El más estudiado de estos inhibidores es el inhibidor de carboxipeptidasa de papa (PCI, de sus siglas en inglés “Potato Carboxipeptidase Inhibitor”) aislado de *Solanum tuberosum* subespecie *tuberosum* cv. Desireé y que fue el primero que se caracterizó por el trabajo pionero de Hass, Neurath, Ryan y colaboradores (Hass and Ryan, 1981; Hass, Neurath, 1976).

El PCI, es una proteína globular de 39 residuos y una de las más pequeñas que se han descrito. Su estructura 3-D se ha determinado en

solución acuosa (Clore, 1987), así como también formando parte de un complejo cristalizado con carboxipeptidasa A (Rees, 1982).



La estructura en solución y el esqueleto dinámico del inhibidor de carboxipeptidasa de papa recombinante fue caracterizado por espectroscopía de resonancia magnética nuclear "RMN" (Gonzalez, 2003). El pliegue del inhibidor se muestra en las siguientes figuras.



Los residuos 8 a 34 constituyen el núcleo globular del PCI, el cual está estabilizado por tres puentes disulfuro y carece de estructura secundaria regular, a excepción de la hélice de 5 residuos cortos internos. Del mismo sobresalen 7 residuos en el extremo N-terminal y cinco residuos hacia el extremo C-terminal (cola C-terminal).



Las flechas blancas señalan los puentes disulfuro.

Ningún papel funcional ha sido asignado hasta el momento a la cola N-terminal (residuos 1-7), cuya conformación parece no estar definida. El PCI pertenece a la super familia de proteínas llamadas “cystine-not” o “T-knot”, llamadas así por su particular patrón de puentes disulfuros (Lin, 1995). La proteína se acumula en las vacuolas. La incapacidad de la pro-forma de inhibir carboxipeptidasas, y su estabilidad a la digestión de carboxipeptidasas, sugieren que el dominio C-terminal puede tener, además de una función vacuolar, como ya se sugirió para la isoforma del tomate (Martineau, 1991), un papel en la modulación de la actividad inhibitoria del PCI (es decir, el proinhibidor, no inhibe la enzima y es estable a su digestión). El extremo C-terminal del PCI se acopla a la carboxipeptidasa A (CPA) penetrando en el sitio activo de, la misma y dando lugar a un mecanismo de inhibición tipo tapón. El inhibidor se comporta como un producto peptídico estrechamente ligado a la proteasa blanco. Su residuo C-terminal (Gly-39) es escindido por la enzima y el resto del inhibidor se mantiene ligado a la enzima por varios contactos.

La importancia funcional de los residuos 35-39 se debe a que es el sitio de contacto primario de la enzima. De hecho, todos los residuos en la cola C-terminal establecen contactos con CPA, excepto Gly-35 (Rees, 1982). Por otra parte, un corto tramo de residuos del núcleo central, es conocido como el sitio secundario de unión (residuos 28-31), situados alrededor del Trp-28. Ambos sitios de unión han sido experimentalmente demostrados por estudios de modificación química (Hass, 1976), por lo que dichas regiones se consideran esenciales para la interacción..

La ingeniería de proteínas está siendo utilizada por varios grupos de investigación para analizar la relación estructura-función del PCI y para una remodelación con fines biotecnológicos. El pequeño tamaño del PCI y el elevado número de restricciones conformacionales que contiene debido a la presencia de tres puentes disulfuros en 27 residuos, constituyen un serio desafío para un rediseño. La mutagénesis en el núcleo fácilmente perturba los enlaces disulfuro y la conformación nativa de la proteína. De hecho, el PCI es un buen modelo para estudiar los problemas relacionados con la ingeniería de pequeñas proteínas ricas en puentes disulfuro. Su pequeño tamaño y la rigidez

interna facilitan la simulación computacional de rediseño de proteínas por aproximaciones de dinámica molecular (MD).



Como ya se ha mencionado, un hallazgo interesante es que el PCI se comporta como un antagonista del EGF (*Epidermal Growth Factor*) y que por lo tanto, podría tratarse de un agente antitumoral putativo (Blanco-Aparicio and Avilés, 1998). Se sabe que el EGF y su receptor (EGFR) están involucrados en muchos aspectos del desarrollo de carcinomas, como el crecimiento de células tumorales, la vascularización, la invasión y metástasis. Como el EGFR se ha encontrado sobreexpresado en muchos tumores de origen epitelial, es un objetivo potencial para la terapia antitumoral. Se ha demostrado que el PCI compite con EGF para unirse al EGFR inhibiendo la activación del mismo y la proliferación celular inducida por este factor de crecimiento. El PCI suprime así el crecimiento de varias líneas celulares de adenocarcinoma pancreático humano, tanto in vitro como en ratones desnudos. Aunque varios inhibidores de proteasas han sido señalados como posibles agentes antitumorales (Trow, 1993), este es el primer caso en que el efecto no es el resultado de su actividad inhibidora de proteasa, sino que su comportamiento es como un antagonista del EGF.

1.3. Aplicaciones de los inhibidores de proteasas

Ha generado un gran interés el hecho que los IPs de plantas pudieran ser usados a nivel comercial. Ya por el año 1991, los IPs de plantas habían sido usados como terapéuticos en diferentes enfermedades y en distintas aplicaciones en los laboratorios de investigación farmacológica (Richardson,

1991; Birk, 1993; Troll *et al.*, 1993; Banerji, 1994; Abdel-Meguid *et al.*, 2000; Leung *et al.*, 2000; Mendes-Silva *et al.*, 2003; Neuhoof *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2004).

Se ha observado que los IPs de muchas plantas inhiben potencialmente el crecimiento de una variedad de cepas bacterianas y fúngicas patógenas, convirtiéndolos en excelentes candidatos para el uso como compuestos principales en el desarrollo de numerosos agentes antimicrobianos (Kim *et al.* 2009). *Cocktails* de inhibidores de proteasas son adicionados rutinariamente en muestras clínicas para ser usados en estudios proteómicos para inactivar proteasas (Jedinak *et al.* 2005), en infecciones parasitarias, fúngicas y virales (Dalton *et al.* 1997), malaria (Dahlgren *et al.* 2003), candidiasis (Abad-Zapatero *et al.* 1998), SIDA (Patick *et al.* 1998), hepatitis (Lin *et al.* 2004), herpes (Clercq, 2004), afecciones inflamatorias (Bilfinger *et al.* 2002) y respiratorias (Cataldo *et al.* 2003; Hugli 1996), cardiovasculares (Boos 2004), coagulopatías (Gladwell 2002) y la enfermedad de Alzheimer (Vassar *et al.* 1999).

La utilización de inhibidores de proteasas en el tratamiento contra el cáncer comenzó como estudios epidemiológicos en donde se podía observar que en las poblaciones vegetarianas alimentadas con leguminosas, la incidencia de cáncer de mamas, colon y próstata era menor (Fontham *et al.* 1993), lo que luego abrió el camino para nuevos estudios en los que se utilizaban inhibidores extraídos de dichas especies vegetales.

Muchos estudios han comprobado que estos inhibidores tienen propiedades supresoras sobre diferentes etapas de distintos tipos de cáncer. El tratamiento con el inhibidor de tripsina y quimotripsina a células irradiadas con rayos X ha disminuido claramente la transformación de las células por esta radiación con respecto a los controles (Yavelow *et al.* 1985).

Otros estudios con células cancerígenas indicaron que los inhibidores actúan sobre diferentes proteasas serínicas que están implicadas en las cadenas de señalización de este tipo de células (Billings *et al.* 1992; Gueven *et al.* 1998; Habres *et al.* 1992).

Por otra parte, otro tipo de aplicación potencial de los inhibidores de proteasas podría ser su utilización para una mejor protección de los cultivos, que se consigue utilizando combinaciones de inhibidores, como se ha visto con

los inhibidores de proteasas de tipo I y II de la papa, producidos por plantas solanáceas como un mecanismo de defensa contra insectos y microbios. (Dunse *et al.* 2010).

OBJETIVOS

En el presente trabajo se pretende:

1) Clonar y secuenciar un nuevo inhibidor de Carboxipeptidasa de Papa (PCI) a partir de una variedad de Papas Andinas.

2) Expresar el nuevo PCI en el sistema bacteriano *E. coli*.

3) Purificar cromatográficamente el IP recombinante y evaluar la actividad inhibitoria sobre CPA.

4) Caracterizar el IP obtenido mediante herramientas de proteómica (PMF, MS, MS/MS) y electroforesis.

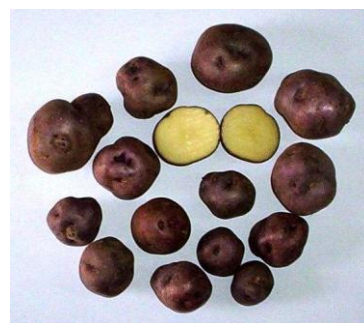
5) Comparar el nuevo PCI con el estudiado hasta el momento, enfocándonos en su sitio secundario de unión.

MATERIALES Y MÉTODOS



3.1 Material Vegetal

Como material de partida se utilizaron tubérculos de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum* variedad Imilla morada, provenientes de la provincia de Jujuy, sobre la quebrada de Humahuaca, Cordillera de los Andes, Argentina. El nombre vulgar de estas especies es de “papas andinas”, y es muy común su cultivo en dichas zonas geográficas.



S. tuberosum es una planta herbácea, tuberosa, perenne a través de sus tubérculos, caducifolia, de tallo erecto o semi-decumbente, que puede medir hasta 1 m de altura (Milan, 1987). El tubérculo es un tallo subterráneo y se halla engrosado a partir de los rizomas (otro tipo de tallo subterráneo), para funcionar como un órgano de almacenamiento de nutrientes pudiendo presentar una forma alargada, redondeada u oblonga (ovalada); su color, en tanto, puede ser blanco, amarillo, violeta o rojizo. En dichos tubérculos se encuentran almacenados, entre otras biomoléculas, inhibidores de proteasas (Dimitri *et al.* 1987).



3.2 Metodología

3.2.1 CLONADO DE UN NUEVO PCI

3.2.1.1 Diseño de cebadores (*primers*) específicos

El diseño de *primers* específicos se realizó a partir de secuencias nucleotídicas de las regiones más conservadas del mRNA codificante para el Inhibidor de Carboxipeptidasa de Papa extraído de *Solanum tuberosum* subespecie *tuberosum* (PCI_t) (Villanueva J, 1998), ampliamente estudiado en dicha familia. Estas regiones se hallan localizadas en las secuencias codificantes para el dominio “pre” de la proteína, mientras que la secuencia para el diseño del primer reverso fue obtenida de regiones conservadas de dominios no codificantes localizadas *downstream* (corriente abajo) al gen que codifica para el inhibidor. En la siguiente tabla se muestran los *primers* diseñados, indicando sus propiedades más relevantes:

		PROPIEDADES DE LA ZONA QUE HIBRIDA		
PRIMERS	SECUENCIA (5'a 3')	Tm	Long	%GC
Fw1	ATTCTCCTTGTGGTTATTGCTGC	60,3	23 nt	43,5
Rv1	GCCACAAAGCATGTATCTAAGAC	56,5	23 nt	43,5

Tabla 1: *Primers* diseñados a partir de dominios conservados del PCI conocido.

La Figura 1 muestra la secuencia del cDNA que codifica para el preproPCI_t, a partir de la cual se diseñaron los *primers* Fw1 y Rv1. En rojo se indica el segmento elegido de la secuencia conservada para el diseño del *primer* Fw1 y en verde la secuencia para el *primer* Rv1. También se subrayan el codón de inicio (ATG), el codón stop (TAA) y dos posibles secuencias de poliadenilación (AATAAA). El sitio de corte entre la región pre y el propéptido se indica con una flecha, mientras la secuencia correspondiente a la proteína madura se presenta dentro del recuadro negro.

```

1  GGTAGATTACATTATGGAAGGTGGATTACATTATTTTATTATTACCATGGCACAAAA 60
      M G R W I H I I F I I T M A Q K
61  ACTTACTATCCTTTTCACCAATTCTCCTTGTGGTTATTGCTGCTCATGACAATTCATTCTA 120
      L T I L F T I L L V V I A A H D N S F Y
      ↓
121 CTCCACGAAAATTCATGTGATGGCCCAAGATGTTGTTCTACCAACGGTGACGAACTTTT 180
      S T K I H V M A Q D V V L P T V T K L F
181 TCAGCAACACGCAGATCCAATTTGTAACAAACCTTGTAACACACGATGATTGCTCTGG 240
      Q Q H A D P I C N K P C K T H D D C S G
241 TGCCTGGTTCTGTCAGGCATGTTGGAATCCGCGCGGACATGTGGGCCCTATGTTGGCGG 300
      A W F C Q A C W N S A R T C G P Y V G G
301 CGCCATGGCCATAGGCCTGTAATTTCAATATTATTGTCTCAAGTGTGTTCTTCTTTTCG 360
      A M A I G L *
361 ACTTTTAGTCCTAAGTGACCTAAGTGTAATTCGAAAAGAAGAAAAAGTATCTATGTCTT 420
421 AGATACATGCTTTGTGGCTAATAATAAATCAACTATGCTTGTTGATTGATATAAATATG 480
481 TTACCAGGGTGTAATATGTAATCACCAAATTAAATAAAAAATCATCATGTTATGTGTGTT (A)n 539

```

Figura 1: Secuencia del cDNA que codifica para el preproPCl₁. Marcada en rojo se observa la región conservada para el diseño de Fw1 y en verde para Rv1.

3.2.1.2 Obtención del cDNA

3.2.1.2.1 Extracción del RNA Total

Con el fin de extraer el RNA de brotes de *Solanum tuberosum* subespecie *Andigenum* variedad Imilla morada, se utilizó el kit RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen. Se cortó aproximadamente 100 mg de brote del material elegido y se colocó en un mortero para luego ser llevado a -80 °C durante 15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se procedió a moler la muestra hasta la obtención de un polvo fino y se colocó en un *ependorf* de 1,5 ml, adicionando 450 µl de buffer RLT del kit conteniendo 4,5 µl de β-mercaptoetanol. Luego se procedió a la extracción siguiendo las indicaciones descritas por el fabricante empleando cromatografía en microcolumnas. El RNA se eluyó con 50 µl de agua libre de RNasas.

3.2.1.2.2 RACE-PCR

La RACE-PCR (*Rapid Amplification of cDNA Ends-Polimerase Chain Reaction*: amplificación rápida de extremos de cDNA-reacción en cadena de la polimerasa) es una técnica que se diseñó para conocer la secuencia de los extremos de un RNA (Frohman *et al.*, 1988). Con este método se generan cDNAs (obtenidos por PCR) que incluyen copia de la secuencia del extremo 3' o 5' del RNA (3'RACE o 5'RACE, respectivamente). La estrategia consiste en añadir una secuencia diana (secuencia inespecífica) en el extremo del cDNA que se desea obtener para luego, empleando además un *primer* específico, amplificar una secuencia del gen buscado.

La 3'RACE-PCR consta de una primera etapa de retrotranscripción (RT) en la que se adiciona la secuencia diana unida a un homopolímero polidT y de una segunda etapa en la que se amplifican por PCR los cDNAs específicos utilizando dos *primers*, uno correspondiente a la secuencia del gen buscado y otro a la secuencia diana.

3.2.1.2.2.1 Reacción de Retrotranscripción (RT)

Para la obtención de la primera cadena de cDNA se diseñó un *primer* con una diana en el extremo 5' seguida del polidT en el extremo 3'. Dicho oligonucleótido se denominó R0R1polidT.

PRIMER	SECUENCIA (5'a 3')
RoR1polidT	CCGGAATTCACTGCAGGGTACCCAATACGACTCACTATAGGGC(T) ₁₄

Tabla 2: Secuencia del primer R₀R₁polidT.

Como paso previo a la reacción de RT, el RNA fue sometido a tratamiento con DNasa I (Fermentas), seguido de un tratamiento térmico (30 min a 37 °C, 10 min a 65 °C) para provocar la ruptura de su estructura secundaria.

MEZCLA DE REACCIÓN DEL TRATAMIENTO CON DNasa I	
Muestra de RNA	10 µl
H ₂ O libre de RNasa	6 µl
Buffer (10 X, c/ MgCl ₂)	2 µl
DNasa I (1 U/µl)	2 µl
EDTA (50 mM)	2 µl

Tabla 3: Mezcla de reacción del tratamiento con DNasa I.

MEZCLA DE REACCIÓN DE RT	
Muestra de RNA tratado	5 µl
H ₂ O libre de RNasa	17,5 µl
RoR1polidT (10 µM)	5 µl
Buffer (5X, c/ MgCl ₂ 20 mM)	10 µl
dNTPs (2,5 mM c/u)	5 µl
Inhibidor de RNasa 40 U/µl	1,25 µl
H ₂ O libre de RNasa	3,75 µl
Retrotranscriptasa (200 U/µl)	2,5 µl

Tabla 4: Mezcla de reacción de la transcripción reversa.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador TECHNE TC-312: 10 min a 65 °C, 60 min a 42 °C y 10 min a 70 °C.

Como control negativo de la retrotranscripción no se agregó muestra de RNA, sustituyendo ese volumen por H₂O libre de RNasa.

3.2.1.2.2.2 Reacción de PCR

Para aislar los productos específicos de la reacción se hizo una PCR utilizando los *primers* específicos Fw1 y Rv1.

MEZCLA DE REACCIÓN DE PCR	
H ₂ O	25,6 µl
Buffer (10 X)	5 µl
dNTPs (10 mM c/u)	5 µl
Primer Fw1 (10 µM)	4 µl
Primer Rv1 (10 µM)	4 µl
DNA Polimerasa FastStart (5U/µl)	0,4 µl
Muestra	5 µl

Tabla 5: Mezcla de reacción de la PCR

La reacción se llevó a cabo utilizando el mismo termociclador que se empleó anteriormente y el siguiente programa: [1x (5 min a 95 °C), 27x (30 seg a 94 °C, 30 seg a 56,5 °C, 25 seg a 72 °C), 5x (30 seg a 94 °C, 30 seg a 59 °C, 25 seg a 72 °C), 1x (10 min a 72 °C), 24x (1 h a 4 °C)]. Los productos de reacción fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1,5%.

3.2.1.3 Electroforesis en geles de agarosa

Los geles de agarosa fueron utilizados para el análisis de las muestras conteniendo DNA. La agarosa tiene menor poder de resolución que la poliacrilamida, pero mayor rango de separación (50 pb hasta algunos megabases de longitud). Pequeños fragmentos (20 pb - 20.000 pb) son mejor resueltos en geles horizontales de agarosa con un campo eléctrico de fuerza y dirección constante.

Se utilizaron dos equipos diferentes de Bio-Rad, Sub-Cell GT para geles de 15x20 cm y Mini Sub-Cell GT para geles de 7x10 cm. La fuente utilizada fue Major Science MP-250V.

3.2.1.3.1 Preparación de las muestras

A las muestras de DNA, previamente a ser sembradas en el gel, se les añadió una décima parte en volumen de buffer de muestra 10x.

BUFFER TRIS-ACÉTICO-ÉDTA (TAE) 50X	
Tris base	242 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	100 ml
Ácido Acético Glacial	57,1 ml
Agua MilliQ c.s.p.	500 ml

Tabla 6: Preparación de buffer Tris-Acético-EDTA (TAE) 50X.

BUFFER MUESTRA 10X	
Buffer TAE (50 X)	1 ml
Glicerol	5 ml
Orange G	15 mg
Agua MilliQ c.s.p.	10 ml

Tabla 7: Preparación de buffer de muestra 10X.

3.2.1.3.2 Preparación de los geles

Los geles fueron preparados empleando el bastidor plástico correspondiente al equipo utilizado en cada caso. La solución fue preparada de la siguiente manera:

GELES DE AGAROSA 1,5 %	ESPESOR 0,75 cm CELDA CHICA	ESPESOR 0,75 cm CELDA GRANDE
Agarosa	0,45 g	1,35 g
Buffer TAE (1X)	30 ml	90 ml
Calentar a ebullición hasta clarificación. Enfriar hasta 60 °C		
Colorante Gel Red	3 µl	9 µl

Tabla 8: Preparación de geles de agarosa 1,5% para celdas grandes y chicas.

Luego de verter esta mezcla en la placa se dejó enfriar hasta su gelificación. Se utilizaron peines de 15 calles con capacidad de 9,7 µl para los geles en celda chica, mientras que para los geles en celda grande se utilizaron peines de 15 calles con capacidad de 20,7 µl.

3.2.1.3.3 Condiciones de corrida

Las muestras se aplicaron bajo buffer con pipeta automática de 20 µl. La electroforesis se desarrolló a voltaje constante manteniendo una relación de 10 mV por cada cm de longitud de gel, empleando buffer de corrida TAE 1X (Tris-acético-EDTA).

3.2.1.4 Purificación de fragmentos de DNA

Habiéndose confirmado mediante electroforesis la presencia de bandas del tamaño esperado en los productos de PCR se procedió a la purificación del DNA. Las bandas de DNA seleccionadas fueron recortadas del gel de agarosa bajo luz UV y tratadas con un kit de extracción de DNA (GeneJET Gel Extraction Kit, Fermentas). Se pesó cada banda cortada y se le agregó 1:1 en volumen de Binding Buffer, continuando con el protocolo descrito por el fabricante hasta obtener una solución final de DNA en 50 µl de agua estéril.

3.2.1.5 Clonado del cDNA

El cDNA aislado fue clonado utilizando una cepa de *Escherichia coli* XL1-Blue competentes (Sambrook *et al.*, 1989) y el vector pGEM-T Easy (Promega).

3.2.1.5.1 Medios de cultivo utilizados

3.2.1.5.1.1 Medios de cultivo líquidos

MEDIO 2YT	
Bacto-Triptona	16 g
Bacto-extracto de levadura	10 g
NaCl	5 g
Disolver en 900 ml de AD y ajustar a pH 7 con NaOH 10 M	
AD, c.s.p.	1 l
Esterilizar en autoclave a 121 °C 15 min. Conservar a T ° ambiente	

Tabla 9: Preparación de medio de cultivo 2YT.

MEDIO LURIA-BERTANI (LB)	
Bacto-Triptona	10 g
Bacto-extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Disolver en 900 ml de AD y ajustar a pH 7 con NaOH 10 M	
AD, c.s.p.	1 l
Esterilizar en autoclave a 121 °C 15 min. Conservar a T ° ambiente	

Tabla 10: Preparación de medio de cultivo LB.

3.2.1.5.1.2 Medios de cultivo sólidos

Para preparar placas de cultivo se trabajó en condiciones de esterilidad cerca de mechero. Cuando la temperatura del medio de cultivo (Tabla 11) alcanzó los 60°C se cargaron las placas de Petri (9 cm de diámetro) con aproximadamente 20 ml de medio fundido cada una y se dejaron solidificar cerca de mechero. Las cajas fueron luego tapadas, colocadas durante 30 min en estufa a 37 °C y conservadas a 4 °C.

MEDIO LURIA-BERTANI (LB)	
Bacto-Triptona	10 g
Bacto-extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agar	15 g
Disolver en 900 ml de AD y ajustar a pH 7 con NaOH 10 M	
AD, c.s.p.	1 l
Esterilizar en autoclave a 121 °C 15 min. Enfriar a 60 °C en estufa antes de plaquear.	

Tabla 11: Preparación de medio de cultivo LB sólido.

3.2.1.5.1.3 Reactivos adicionales

SOLUCIÓN DE 5-Br-4-Cl-3-Indol- β -D-galactósido 20 mg/ml (X-Gal)	
X-Gal, Roche	400 mg
N, N'-dimetilformamida, Sigma c.s.p.	20 ml
Conservar a -20 °C en alícuotas de 1 ml.	

Tabla 12: Preparación de solución de X-Gal 20 mg/ml.

SOLUCIÓN DE AMPICILINA (100 mg/ml)	
Ampicilina, Sigma	1 g
Agua MilliQ c.s.p.	10 ml
Esterilizar por filtración y conservar a -20 °C en alícuotas de 1 ml.	

Tabla 13: Preparación de solución de Ampicilina 100 mg/ml.

SOLUCIÓN DE Isopropil- β -D-tiogalactósido 0,1 M (IPTG*)	
IPTG, Roche	1,19 g
Agua MilliQ c.s.p.	50 ml
Esterilizar por filtración y conservar a -20 °C en alícuotas de 1 ml.	

Tabla 14: Preparación de solución de IPTG 0,1 M.

* IPTG es un análogo no fermentable de la lactosa que inactiva al represor del operón lacZ.

3.2.1.5.2 Obtención de células *E. coli* competentes

Se procedió según el protocolo descrito por *Sambrook et al.* (1989). Se partió de un cultivo puro en etapa de crecimiento exponencial, para lo cual se inocularon las células de una colonia de *E. coli* aislada de un cultivo en placa LB en 5 ml de medio de cultivo 2YT (cfr. 3.2.1.5.1) y se incubaron a 37 °C durante toda la noche con agitación a 250 rpm. Una alícuota de 100 μ l de este cultivo fue inoculada en 10 ml de medio fresco y se hizo crecer en las mismas condiciones hasta una densidad óptica de 0,6 (DO 600nm).

El cultivo obtenido en estas condiciones se mantuvo en baño de hielo durante 10 min y luego se centrifugó a 4 °C durante 10 min a 3000 rpm. Trabajando bajo campana de flujo se eliminó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 5 ml de CaCl₂ 0,05 M estéril. Nuevamente se dejó en baño de hielo durante 10 min, se centrifugó como se indicó anteriormente y luego de descartar el sobrenadante asépticamente las células fueron cuidadosamente resuspendidas en 1 ml de CaCl₂ estéril 0,05 M preenfriado a 4 °C.

La suspensión de células fue almacenada en heladera a 4 °C durante toda la noche, luego se tomaron alícuotas de 100 μ l y a cada una de ellas se le adicionó 23 μ l de glicerol 80% (v/v) estéril. Cada alícuota de suspensión de células competentes fue almacenada a -80 °C hasta el momento de ser utilizada.

3.2.1.6 Clonación

3.2.1.6.1 Vector de clonado

El vector pGEM-T Easy contiene los promotores de las RNA polimerasas T7 y SP6, flanqueando una zona de clonado múltiple dentro de la región codificante de la enzima β -galactosidasa (*lacZ*), lo que permite secuenciar el inserto introducido en el vector empleando los *primers* correspondientes. La zona de clonado múltiple incluye sitios de digestión para diferentes enzimas de restricción, lo que permite la liberación de insertos. En cada uno de sus extremos lleva además una timidina 3' terminal, lo que aumenta la eficiencia de ligación con productos de PCR obtenidos con DNA polimerasas sin actividad de 3'→5' exonucleasa, las que suelen añadir una adenina 3' terminal. El vector posee además una región que codifica para la β -lactamasa (*Amp^r*), con lo que las bacterias sensibles a ampicilina se vuelven resistentes al ser transformadas con el vector pGEM-T Easy.

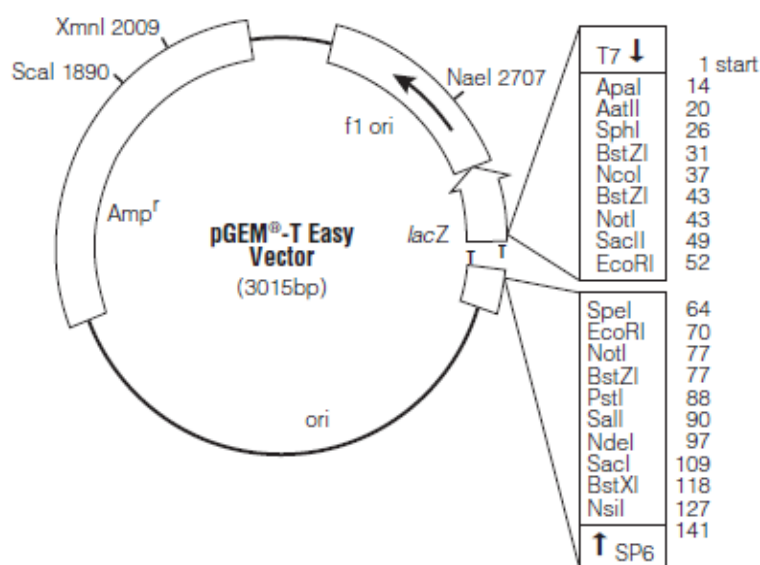


Figura 2: Vector pGEM-T Easy (Promega).

Cuando se liga un inserto al vector se produce una interrupción en el marco de lectura de la región que codifica para la β -galactosidasa, lo que impide la expresión de esta enzima. Dado que la acción de la β -galactosidasa

sobre el X-Gal hace que se libere un compuesto de color azul, la inserción de un fragmento de DNA en el vector se evidencia por la ausencia de color azul.

3.2.1.6.2 Ligación

Los fragmentos de DNA seleccionados y purificados (cfr. 3.2.1.4) fueron ligados al vector pGEM-T Easy. La mezcla de ligación se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega).

MEZCLA DE LIGACIÓN	
Buffer de ligación (2X)	5 µl
Vector pGEM-T Easy (50 ng/µl)	0,5 µl
DNA (cfr. 1.4)	3,5 µl
DNA ligasa T4 (3 U/µl, Promega)	1 µl
Incubar a 4 °C toda la noche.	

Tabla 15: Mezcla de reacción de la ligación.

3.2.1.6.3 Transformación y Selección de clones

La transformación se realizó agregando 5 µl de la mezcla de ligación (cfr. 3.2.1.6.2) a una alícuota de 50 µl de *E. coli* XL1-Blue competentes (cfr. 3.2.1.5.2) siguiendo un protocolo de shock térmico (30 min en hielo, 45 seg a 42 °C, 5 min en hielo).

A la suspensión de células proveniente de la mezcla de transformación se le añadió 1 ml de medio LB (cfr. 3.2.1.5.1.1) y se incubó durante 1 hora a 37°C en estufa de cultivo, con agitación a 250 rpm. A continuación se centrifugó 1 min a 3000 rpm; y a partir de aquí se trabajó en condiciones de esterilidad cerca de mechero. Se desecharon 900 µl de sobrenadante, las células fueron cuidadosamente resuspendidas en el sobrenadante restante y trasvasadas con pipeta automática a una placa de Petri con medio LB conteniendo ampicilina (100 µg/ml), IPTG (112 µg/ml) y X-Gal (80 µg/ml) (cfr. 3.2.1.5.1). Utilizando una espátula de Drigalsky se extendió homogéneamente la suspensión de células y luego de secar los restos de humedad en cercanías de mechero, se incubó durante toda la noche en estufa a 37 °C.

La selección de los clones se basa en las observaciones que se describen en la siguiente tabla:

SELECCIÓN DE CLONES	
Células sin vector	No crecen
Células con vector sin inserto	Colonias azules
Células con vector con inserto	Colonias blancas

Tabla 16: Observaciones a realizar para la selección de clones.

Las colonias blancas fueron seleccionadas para verificar por PCR que contuvieran el inserto buscado. Cada una de ellas fue aislada con un palillo de madera estéril y colocada en un tubo *ependorf* para realizar la reacción de PCR (cfr. 3.2.1.2.2.2) utilizando los *primers* específicos Fw1 y el Rv1 (cfr. 3.2.1.1). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (cfr. 3.2.1.3).

Por otra parte, se prepararon inóculos con el fin de obtener cultivos que permitan inmortalizar los clones. A tal efecto cada uno de los palillos utilizados anteriormente, conteniendo remanentes de la colonia aislada, fue introducido en un tubo conteniendo 3,5 ml de medio de cultivo LB con 50 µg/ml de ampicilina (cfr. 3.2.1.5.1). Los inóculos de cada uno de los clones fueron incubados a 37 °C con agitación (200 rpm) durante toda la noche.

3.2.1.6.4 Glicerinado de los clones

Se tomó una alícuota de 400 µl de cada cultivo creciendo en fase exponencial a la que se le añadió 92 µl de glicerol 80% (v/v) estéril; cada suspensión fue rápidamente homogeneizada y congelada a -80 °C. Los clones así tratados pueden ser conservados por largos períodos.

3.2.1.7 Secuenciación del cDNA clonado

3.2.1.7.1 Aislamiento del DNA plasmídico

Se utilizó un kit de extracción, GeneJET Plasmid Miniprep Kit, (Fermentas). La técnica consiste en lisar las células y eliminar restos celulares y proteínas. Luego el DNA plasmídico queda retenido en pequeñas columnas cromatográficas y es eluído con agua MilliQ estéril.

Para obtener el DNA plasmídico se tomó una alícuota de 1,5 ml proveniente del cultivo de interés (cfr. 3.2.1.6.3). Se centrifugó a 14000 rpm durante 30 seg y se eliminó el sobrenadante. Las células obtenidas fueron lisadas con el buffer de lisis y en el mismo tubo se agregaron los buffers de precipitación, eliminando el sólido por centrifugación. El sobrenadante fue pasado a través de la columna cromatográfica quedando retenido el DNA plasmídico. Luego de los pasos de lavado se realizó la elución con agua MilliQ estéril.

3.2.1.7.2 Digestión con Enzimas de Restricción

Esta etapa fue realizada con el objeto de confirmar la presencia de insertos específicos dentro del vector en cuestión. Se utilizó el protocolo descripto a continuación.

DIGESTIÓN DE DNA CON Not I	
Buffer Multi-Core (10 X)	2 µl
BSA (10 µg/µl)	0,2 µl
Not I (Fermentas)	0,5 µl
Muestra de DNA	1 µl
Agua MilliQ	16,3 µl
Incubar en estufa a 37 °C durante 3 horas.	

Tabla 17: Mezcla de reacción para la digestión con Not I.

Los productos de la digestión fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (cfr. 3.2 1.3). Recordando el mapa de restricción del vector de clonado, el empleo de la enzima Not I produce un corte a cada lado

del cDNA inserto en el vector, por lo tanto su empleo produciría la liberación de dicho fragmento.

3.2.1.7.3 Secuenciación del DNA

Las muestras fueron sometidas a secuenciamiento automático bajo el servicio de Macrogen Inc., Corea, empleando como material de partida la construcción descrita anteriormente y efectuando las amplificaciones pertinentes valiéndose de los *primers* específicos de los promotores T7 y SP6, ambos incluidos en el vector pGEM-T Easy (cfr. 3.2.1.6.1).

3.2.1.7.4 Análisis de las secuencias de los cDNAs

Las secuencias obtenidas de los cDNAs de los clones fueron analizadas con un software de alineamiento [Clustal-W (Thompson *et al.*, 1994)] para obtener una secuencia consenso. La secuencia consenso fue traducida en los seis marcos de lectura con el software *Translate Tool* disponible en el servidor de ExPASy para poder identificar la presencia de elementos conservados en la secuencia aminoacídica de familias conocidas de inhibidores de carboxipeptidasa A. Al mismo tiempo se hizo una búsqueda por PSI-BLAST utilizando la base de datos NCBI nr y restringiéndola al reino *Viridiplantae*.

3.2.2. EXPRESIÓN DEL NUEVO PCI

En nuestro laboratorio ya se disponía de una construcción de expresión pIN-III-OmpA3_PCI_t. Debido a ésto basamos nuestra estrategia en el reemplazo de la secuencia correspondiente al PCI_t, por la secuencia del nuevo PCI_a clonado.

3.2.2.1 Diseño de *primers* para expresión

Se diseñaron los *primers* Fw2 y Rv2 para aislar el cDNA completo del PCI_a, que luego fue insertado en el vector de expresión. Para ello empleamos una herramienta muy valiosa en el campo de la biología molecular, las enzimas de restricción. El *primer* Fw2 contiene una diana de corte para la enzima de restricción BamH I y homología con la secuencia nucleotídica correspondiente al N-terminal del péptido. Por su parte Rv2 contiene una diana de corte para la

enzima de restricción EcoR I y la secuencia que corresponde al extremo C-terminal del PCI_a. De esta forma, el empleo de dichos *primers* permite el reemplazo en el vector de expresión, de la secuencia correspondiente al PCI_t por la del nuevo PCI.

3.2.2.2 Obtención de la Construcción de Expresión

La expresión de una proteína heteróloga requiere la inserción del gen en un vector de expresión, para introducirlo en el genoma de *E. coli*. El vector de expresión utilizado fue el pIN-III-OmpA3, que contiene el promotor del operón lac, en el cual se inserta el gen que codifica para la proteína de interés, posee además un fragmento de DNA que codifica para el péptido señal OmpA de modo que la proteína expresada sea secretada al medio extracelular y las construcción de tres sitios únicos de clonado en tres marcos de lectura diferentes (Ghrayeb, J., Kimura, H., Takahora, M., Hsiang, H.).

3.2.2.2.1 Aislamiento del cDNA del nuevo PCI

Como mencionamos anteriormente, partimos de una construcción pIN-III-OmpA3_PCI_t, por lo que se realizó una digestión doble con BamH I y EcoR I para eliminar el PCI_t. Los productos de reacción fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1,5% y se purificó el correspondiente al vector utilizando el kit de extracción de DNA (GeneJET Gel Extraction Kit, Fermentas) (cfr. 3.2.1.4).

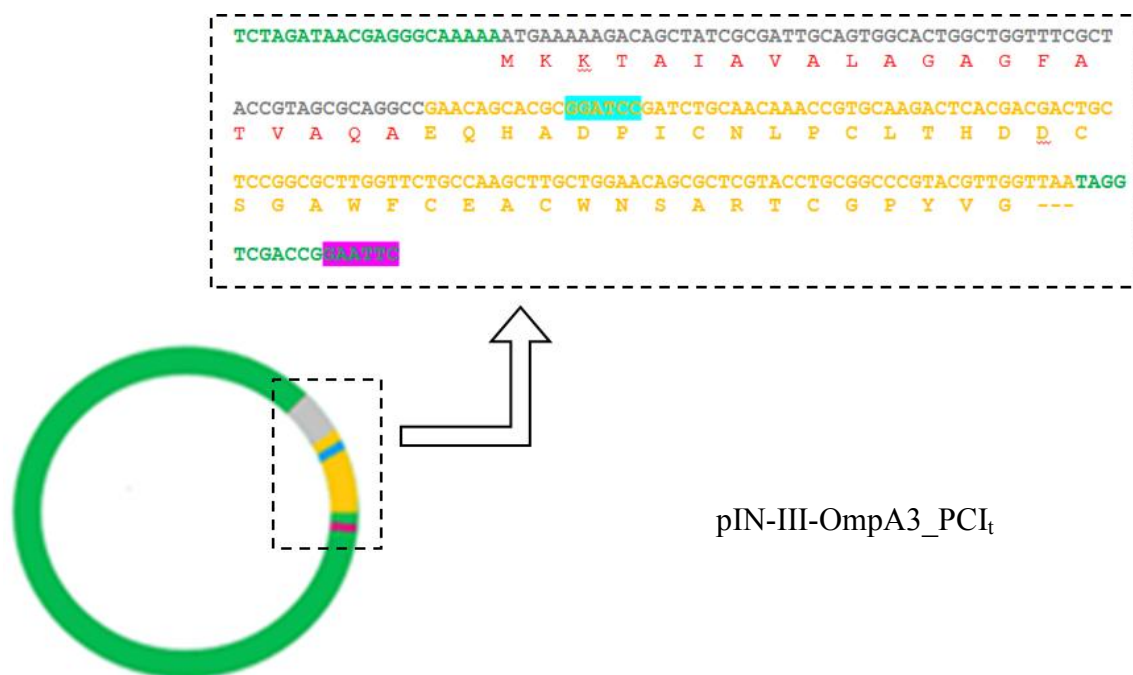


Figura 3. Construcción pIN-III-OmpA3_PCI_t. En verde se muestra la secuencia del vector pIN-III-OmpA3, en gris la secuencia del péptido señal OmpA3 y en amarillo la secuencia del PCI_t. Resaltado en turquesa se observa el sitio de restricción para BamH I mientras que en fucsia se observa el sitio para EcoR I.

A partir de la construcción preproPCI_a parcial/pGEM-T Easy, se amplificó la secuencia del nuevo PCI empleando los *primers* ya mencionados, Fw2 y Rv2.

MEZCLA DE REACCIÓN DE PCR	
H ₂ O	24,2 µl
Buffer (5X)	10 µl
dNTPs (10 mM c/u)	5 µl
Primer Fw2 (10 µM)	4 µl
Primer Rv2 (10 µM)	4 µl
DNA Polimerasa GoTaq (5 U/µl)	0,3 µl
Muestra	2,5 µl

Tabla 18: Mezcla de reacción de PCR

La reacción se llevó a cabo utilizando el siguiente programa: [1x (2 min a 94 °C) 27x (15 seg a 94 °C, 30 seg a 47,4 °C, 30 seg a 72 °C) 1x (2 min a 72 °C) 24x (1 hora a 4 °C)]. Los productos de reacción fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (cfr. 3.2.1.3) y purificados utilizando el kit de extracción de DNA (GeneJET Gel Extraction Kit, Fermentas) (cfr. 3.2.1.4)

3.2.2.2.2 Clonado del cDNA del nuevo PCI

Una alícuota del DNA purificado fue ligada al vector de clonado pGEM-T Easy (cfr. 3.2.1.6.1). Los productos de ligación fueron clonados en *E. coli* XL1-Blue siguiendo el protocolo descrito en 3.2.1.6. Los clones transformados se seleccionaron haciéndolos crecer en placas de LB con ampicilina (100 µg/ml), IPTG (112 µg/ml) y X-Gal (80 µg/m) (cfr 3.2.1.5.1) en estufa de cultivo a 37 °C durante toda la noche. El vector pGEM-T Easy le confiere a las células resistencia a ampicilina, por lo que sólo aquellas células que contengan al vector crecerán en este medio. La selección de clones recombinantes se efectúa de acuerdo a la coloración blanca/azul de las colonias (cfr. 3.2.1.6.3).

3.2.2.2.3 Ligación del cDNA del nuevo PCI al vector de expresión

El aislamiento del DNA plasmídico se efectuó de acuerdo al procedimiento descrito en 3.2.1.7.1. Una alícuota del DNA de uno de los clones seleccionados fue digerida con las enzimas EcoR I y BamH I. Dado que ambas utilizan el mismo buffer de reacción, la digestión se realizó en una sola etapa (digestión doble). Al mismo tiempo se hizo la digestión doble de la construcción PCI₁/pIN-III-OmpA3 con las mismas enzimas de restricción.

Los productos de digestión se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 1,5% (cfr. 3.2.1.3) y posteriormente fueron extraídos del gel (cfr 3.2.1.4).

Finalmente se obtuvo la construcción de expresión PCI_a/pIN-III-OmpA3 mediante la ligación con T4 DNA Ligasa (cfr. 3.2.1.6.2) de los productos de digestión.

3.2.2.3 Clonado en pIN-III-OmpA3

Los productos de ligación fueron transformados químicamente en *E. coli* BL21 (DE3) siguiendo el protocolo descrito en 3.2.1.6.3. Los clones transformados se seleccionaron haciéndolos crecer en placas de LB (cfr. 3.2.1.5.1) conteniendo ampicilina (100 µg/ml) e IPTG (112 µg/ml) en estufa de cultivo a 37 °C durante toda la noche.

3.2.2.4 Producción de la proteína recombinante

3.2.2.4.1 Medios de cultivo utilizados

3.2.2.4.1.1 Medios de cultivo líquidos

MEDIO BAT	
Sales 10X M9	100 ml
MgSO ₄ (1 M)	1 ml
CaCl ₂ (0,1) M	3 ml
Tiamina (1 M)	1 ml
Glicerol (80 % v/v)	6,25 ml
Oligoelementos	1 ml
Cas aas (20%)	10 ml
Agua desionizada	Vol final 1 l
Cada una de las disoluciones se esterilizan por separado en autoclave, a excepción de la tiamina que se filtra (en membrana de 0,22 µm)	

Tabla 19: Preparación de medio de cultivo BAT.

Sales 10xM9	
Na ₂ HPO ₄	71,8 g
KHPO ₄	30 g
NH ₄ Cl	10 g
NaCl	5 g
Agua desionizada	vol final 1 l
Se ajusta el pH a 7,2 usando NaOH y se autoclava	

Tabla 20: Composición de sales para el medio BAT.

Oligoelementos	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	40 mg/l
MnSO ₄ H ₂ O	10 mg/l
CoCl ₂ 6H ₂ O	4 mg/l
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2 mg/l
Na ₂ MoO ₄	2 mg/l
CuCl ₂ ·2H ₂ O	1 mg/l
AlCl ₃	1 mg/l
H ₃ BO ₃	0,5 mg/l

Tabla 21: Composición de oligoelementos para el medio BAT.

3.2.2.4.2 Expresión en *E. coli*

Algunas de las colonias blancas obtenidas fueron aisladas con un palillo de madera estéril que fue introducido en un tubo conteniendo 20 ml de medio LB con ampicilina 100 µg/ml e incubado a 37 °C con agitación (250 rpm) durante toda la noche. Una vez finalizado el crecimiento del preinóculo, se diluyeron 10 ml en 1 l de medio mínimo de expresión (dilución 1:100) (cfr 3.2.2.4.1), con crecimiento en estufa de cultivo a 37°C con agitación a 200 rpm hasta obtener una densidad óptica de 0,6 (DO a 600nm). Pasado este tiempo se agregó IPTG hasta alcanzar concentración final 0,2 mM, continuando con el crecimiento bajo las mismas condiciones de cultivo durante 20 horas.

Finalizado este tiempo se centrifugó 20 min a 4 °C y 6000 rpm con el objeto de separar los restos celulares.

3.2.2.4.3 Reordenamiento de los puentes disulfuro

Una vez colectado el sobrenadante, conteniendo la proteína madura del nuevo PCI, se procedió al reordenamiento de los puentes disulfuro – *reshuffling*-. Este proceso se realizó en presencia de cisteína 4 mM y cistina 2 mM, ajustando a pH 8,5 con NaOH para posterior incubación de 3 horas a temperatura ambiente y durante toda la noche a 4°C, con agitación. (Chang, J. 1994)

3.2.2.4.4 Clarificación y centrifugado

Una vez transcurrido el *reshuffling* se ajustó el pH en un valor de 4,0 con ácido cítrico, se incubó toda la noche a 4 °C y se colectó el sobrenadante por centrifugado a 7000 rpm durante 20 minutos, dando inicio a la fase de purificación.

3.2.3. PURIFICACIÓN DEL NUEVO PCI

Al finalizar cada paso de purificación se eligió como método de seguimiento del grado de pureza de la muestra, la realización de una cromatografía en fase reversa a alta presión (RP-HPLC). Además de ser útil para este propósito, dicha técnica fue elegida como último paso de purificación.

3.2.3.1 Cromatografía de intercambio iónico

El primer paso de purificación consistió en una cromatografía de intercambio catiónico empleando una resina HST-Streamline y adaptadores FPLC (Pharmacia, Uppsala, Sweden), desarrollada en un equipo de purificación ÄKTA, GE.

En este proceso se cargaron 15 ml de muestra a la columna y se equilibró con buffer citrato de sodio 100 mM de pH 4. A continuación se aplicó un gradiente de pH desde 4 a 8,5 (cromatoenfoque) utilizando citrato de sodio 20 mM de pH 4 y fosfato de sodio 100 mM de pH 8,5. La cromatografía fue monitoreada espectrofotométricamente por medidas de absorbancia a 280 nm, longitud de onda a la cual absorben los aminoácidos aromáticos de las proteínas.

3.2.3.2 Cromatografía en fase reversa a presión normal

El siguiente paso de purificación se realizó por cromatografía en fase reversa a presión normal utilizando una resina de C18 (Sep-Paks C18, Waters) que fue activada con 100% de acetonitrilo y luego cargada con 34 ml del material eluido en el paso anterior. En primer lugar se lavó la columna con agua y a continuación se realizó un gradiente escalonado de cuatro volúmenes de columna cada uno utilizando como eluyentes acetonitrilo 10 %, isopropanol

30% y acetonitrilo 100 % respectivamente. Cada fracción eluída se secó en SpeedVac y finalmente se resuspendió en TFA 0.1 %.

3.2.3.3 Cromatografía en fase reversa a alta presión

El siguiente paso de purificación consistió en una cromatografía en fase reversa a alta presión, RP-HPLC. Se empleó una columna Nova-Pak C18 (Waters) de 150 x 3.9 mm. El material de relleno estaba formado por un soporte de sílice que contenía cadenas hidrocarbonadas de 4 a 8 átomos de carbono. La elución de la proteína se efectuó empleando un gradiente creciente de 20-40% de acetonitrilo en 30 min bajo un flujo de 70 ml/min. La elución fue monitoreada espectrofotométricamente por medidas de absorbancia a 280 nm.

Como mencionamos anteriormente, esta cromatografía también se empleó al finalizar cada paso de purificación para hacer el seguimiento de la muestra.

3.2.4. CARACTERIZACIÓN DEL NUEVO PCI

3.2.4.1. Actividad inhibitoria de Carboxipeptidasa A

Para verificar que la proteína expresada posee actividad inhibitoria de Carboxipeptidasa A (CPA) se incubó a 37°C 800 µl de buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8,4 con NaCl 0,2 M, 100 µl de muestra y 7,5 µl de la solución de CPA durante 3 minutos. Seguidamente se agregaron 2,5 µl del sustrato específico N-(4-metoxifenilazoformil)-Phe-OH, de color naranja, en concentración 10 mM (Mock, Liu, & Stanford, 1996).

La reacción se llevó a cabo a 37°C efectuando el registro de actividad durante 3 min mediante el descenso de la absorbancia a 350 nm durante 120 seg, considerando que la hidrólisis del sustrato produce la desaparición del color naranja.

3.2.4.2 Caracterización Proteómica

3.2.4.2.1 Determinación de peso molecular por MALDI-TOF

La espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization- Time Of Flight*) fue utilizada en la determinación de la masa molecular del inhibidor así como también para la determinación del grado

de pureza. Para ello se usó un espectrómetro de masas UltrafleXtreme MALDI-TOF de Bruker Daltonics, equipado con un láser de nitrógeno de 337 nm; dicho equipo pertenece al Laboratorio de Proteómica y Bioingeniería de Proteínas del Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBB) de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), España. Para el análisis, 1 µl de muestra fue mezclada con 1 µl de solución saturada de ácido α -4-hidroxicinámico (HCCA) como matriz y depositada a continuación sobre una placa de siembra (MP 384 Ground Steel, Bruker), dejando secar a temperatura ambiente (Hillenkamp and Karas, 1990; Alonso-del-Rivero, 2009). Se analiza la muestra usando un método en modo reflectrón y un voltaje de aceleración de 25 kv. Los análisis se calibran usando calibradores peptídicos externos.

3.2.4.2.2. PMF MALDI-TOF

3.2.4.2.2.1 Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) es un sistema muy adecuado para la separación de polipéptidos y proteínas en el rango de 5 a 100 kDa. La tricina es utilizada como ión de arrastre en el buffer catódico, permitiendo una mayor resolución de proteínas pequeñas a menores concentraciones de acrilamida comparado con el caso del clásico buffer tris-glicina (Laemmli 1970). Se logra una resolución superior de polipéptidos, sobre todo en el rango de 5 a 20 kDa, con un sistema de dos geles de diferente concentración: un gel de apilamiento (4% T y 3% C), y un gel de resolución (16,5% T y 3% C).

Otra ventaja de este sistema, si se lo desea emplear como purificación previa al microsecuenciamiento, es que la omisión de glicina previene interferencias.

3.2.4.2.2.1.1 Preparación de las muestras

El producto de expresión se redisolvió en buffer de muestra 6X para electroforesis y se llevó a ebullición durante 5 min.

BUFFER DE MUESTRA 6X	
Tris	9,42 g
SDS	12 g
Mercaptoetanol	30 ml
Glicerol	48 ml
Azul de Bromofenol	12 mg
Llevar a pH 6,8 con HCl 1 M	
AD c.s.p.	100 ml

Tabla 22: Preparación de buffer de muestra 6X.

3.2.4.2.2.1.2 Preparación de los geles

Los geles se moldearon empleando el soporte provisto a tal efecto con el equipo Mini-Protean III Bio-Rad. La composición de los buffers y de los geles se indica a continuación:

BUFFER DEL GEL	
Tris	36,3 g
SDS	0,3 g
Llevar a pH 8,45 con HCl 1 M	
AD c.s.p.	100 ml

Tabla 23: Preparación de buffer del gel.

GEL DE APILAMIENTO (4% T, 3% C)	
Acril-Bis (49,5:3)	0,4 ml
Buffer del gel	1,250 ml
AD	3,4 ml
PSA 10 %	0,04 ml
TEMED	0,007 ml
Llevar a pH 6,8 con HCl 1 M	
AD c.s.p.	100 ml

Tabla 24: Preparación de gel de apilamiento.

GEL DE RESOLUCIÓN (16,5% T, 3% C)	
Acril-Bis (49,5:3)	3,3 ml
Buffer del gel	3,3 ml
AD c.s.p.	3,4 ml
PSA 10 %	0,04 ml
TEMED	0,007 ml

Tabla 25: Preparación de gel de resolución.

3.2.4.2.2.1.3 Aplicación de muestras y condiciones de corrida

Se aplicó la muestra y en los reservorios anódico y catódico de una celda Miniprotean III Bio-Rad se colocaron los correspondientes sistemas buffer.

BUFFER ANODICO 2M	
Tris	24,2 g
Llevar a pH 8,9 con HCl 1 M	
AD c.s.p.	1000 ml

Tabla 26: Preparación de buffer anodico 2M.

BUFFER CATODICO 1M	
Tris	12,1 g
Tricina 0,1 M	17,9 g
SDS 0,1 %	1 g
AD c.s.p.	1000 ml

Tabla 27: Preparación de buffer catódico 1M.

Las corridas se realizaron a voltaje constante (30 V) durante el apilado, luego se aumentó lentamente hasta 105 V al ingresar las proteínas al gel espaciador, valor que se mantuvo constante hasta la finalización de la electroforesis.

3.2.4.2.2.1.4 Fijación y Tinción

Finalizada la electroforesis, los geles fueron fijados en solución fijadora durante 30 min (los péptidos no se fijan completamente, pueden difundir si no se respetan los tiempos; y se recomienda un máximo de fijación de 45 minutos) y teñidos por inmersión en solución colorante durante una hora (se recomienda un máximo de coloración de una hora y media). Posteriormente se hicieron sucesivos lavados con solución decolorante para eliminar la coloración de fondo. Esta coloración tiene una sensibilidad de 0,2 a 0,5 µg por banda.

SOLUCION FIJADORA	
Acido acético glacial	100 ml
Metanol	400 ml
AD c.s.p.	1000 ml

Tabla 28: Preparación de solución fijadora.

SOLUCION COLORANTE	
Acido acético glacial	100 ml
Coomassie brilliant blue R-250	250 mg
AD c.s.p.	1000 ml

Tabla 29: Preparación de solución colorante.

SOLUCION DECOLORANTE	
Acido acético glacial	100 ml
AD c.s.p.	1000 ml

Tabla 30: Preparación de solución decolorante.

3.2.4.2.2.2 Digestion triptica

La banda seleccionada de la electroforesis anterior fue cortada en trozos pequeños y colocada en un tubo *ependorf*. A continuación fue lavada con agua MQ y acetonitrilo 50 % varias veces para remover el colorante y secada en vacío. Los fragmentos del gel fueron cubiertos por una solución de DTT 20

mM por 20 min a 60 °C, luego fueron centrifugadas y lavadas con acetonitrilo por 5 min. Los fragmentos fueron incubados en una solución de iodoacetamida 25 mM por 15 min a 37 °C y oscuridad, y lavados con agua MQ y acetonitrilo alternativamente. La digestión trípica fue lograda usando buffer NH_4HCO_3 100 mM pH: 8,5 conteniendo tripsina (4ng/ μl) por 12 hs a 37 °C. Los péptidos resultantes fueron recuperados por extracción con acetonitrilo al 50 % (v/v) y luego secados en un SpeedVac, redisueltos en TFA al 0,2 % (v/v).

3.2.4.2.2.3 Determinación de la huella peptídica

El inhibidor recombinante purificado se analizó por huella peptídica (*peptide mass fingerprinting*, PMF), previa digestión trípica de una banda electroforéticamente homogénea (Obregón et al., 2009). Los péptidos fueron disueltos en 5 ml de TFA 0,1%(v/v) y analizados por MALDI-TOF MS usando una matriz de HCCA. La identificación del mapa trípico se intentó obtener usando el programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) según los siguientes parámetros de búsqueda: (1) Tipo de búsqueda, *Peptide mass Fingerprint*; (2) Enzima, tripsina; (3) Base de datos, SwissProt 55.2; (4) Taxonomía, *Viridiplantae*; (5) Modificaciones variables, Metilcarbamida (C), Oxidación (M); (6) Valores de masas, monoisotópico; (7) Tolerancia del peso de la proteína, ± 100 ppm; (8) Carga de la proteína, +1.

Adicionalmente, la secuencia correspondiente al cDNA del nuevo inhibidor fue sometida a digestión trípica teórica empleando el software SequenceEditor 3.1 (Bruker Daltonics, Biotools 3.1) y comparada con la obtenida empíricamente.

3.2.4.2.3 Secuenciación de péptido interno e identificación por PMF-MALDI-TOF/TOF

Para realizar la espectrometría MS/MS, los iones generados por el proceso de PMF-MALDI-TOF/MS se aceleraron a 8 kV a través de una red a 6,7 k. Los iones pasan a través de un dispositivo temporizado ion-selector (*timed-ion-selector*) que es capaz de seleccionar un péptido a partir de una mezcla de péptidos a diferentes valores de m/z para su posterior fragmentación en la celda de colisión. En este caso fue seleccionado por el *timed-ion-selector*

el péptido con m/z 1596,7 Da; el mismo pasa a través de una lente de retardo donde se desaceleran los iones y luego pasa a la celda de colisión, que se hizo funcionar a 7 kV. La fragmentación se realiza en el modo de descomposición metaestable sencilla (sin gas de colisión y con el conjunto de la energía de colisión a 1 kV). De esta manera se obtiene un espectro de fragmentación utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF/ MS-MS. Finalmente, se procedió al análisis de los espectros de fragmentación de los péptidos mediante comparación con la información disponible en la base de datos utilizando la herramienta de búsqueda MASCOT (<http://www.matrixscience.com>); los algoritmos matemáticos usados por este servicio compara todos los espectros de todas las proteínas que estén disponibles.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CLONADO Y SECUENCIAMIENTO DEL NUEVO PCI

4.1.1 Aislamiento del cDNA

Se extrajo el RNA total a partir de brote de *Solanum tuberosum* especie *andigenum* subespecie Imilla morada (cfr. 3.1), con el propósito de obtener el cDNA que codifica para el Inhibidor de Carboxipeptidasa de Papa (PCI_a) mediante transcripción reversa (RT) y 3' RACE-PCR (cfr. 3.2.1.2).

En primer término se obtuvo la primera cadena de cDNA por RT (cfr. 3.2.1.2.2.1) empleando el primer R₀R₁polidT (Figura 1).

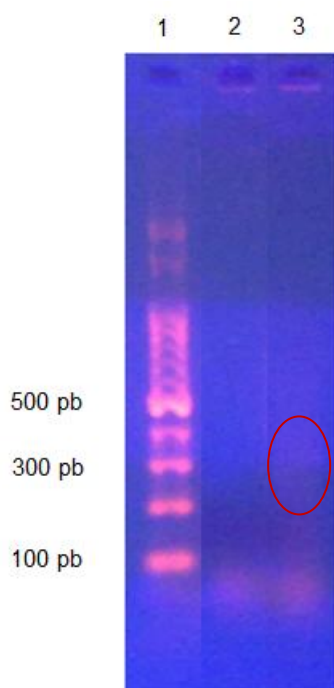


Figura 1: Electroforesis de agarosa 1,5% de los productos de RT. Calle 1: Patrón de peso molecular de 100 pb (PB-L). Calle 2: Control negativo de RT. Calle 3: RT sobre RNA extraído de *Solanum tuberosum* subespecie *Andigenum* variedad “Imilla morada”.

Luego, utilizando como molde la cadena de cDNA obtenida en el paso anterior y los *primers* específicos de secuencia Fw1 y Rv1, se obtuvieron por PCR (cfr. 3.2.1.2.2.2) productos del tamaño esperado para moléculas de cDNA de unos 360 pares de bases aproximadamente (120 residuos de aminoácidos), que codifican para los últimos 7 aminoácidos de la región pre y para el proPCI_a completo, denominada a partir de ahora “secuencia parcial de preproPCI_a”. La Figura 2 corresponde a la electroforesis en agarosa 1,5% (cfr. 3.2.1.3) de los productos de PCR de los cDNAs obtenidos de la RT.

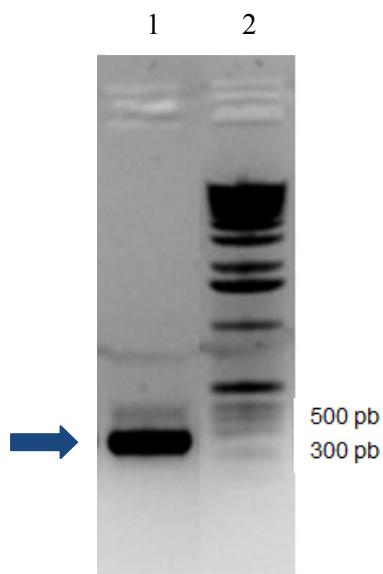


Figura 2: Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de PCR de los cDNAs obtenidos de la RT, mediante empleo de *primers* Fw1 y Rv1. Calle 1: cDNA de muestra de brote de *S. tuberosum* ssp. *Andigenum* var. Imilla morada. Calle 2: Patrón de peso molecular Roche X.

En la calle 1 se observan bandas de 300 – 400 pb que corresponden al tamaño esperado para el cDNA que codifica para el preproPCl_a parcial.

4.1.2 Clonado del cDNA del preproPCl_a parcial

El cDNA proveniente de las bandas seleccionadas de la electroforesis anterior (Figura 2), fue extraído del gel y purificado. Posteriormente fue ligado al vector de clonado pGEM-T Easy empleando T4 DNA ligasa, para luego realizar la transformación de células *E. coli* XL1Blue competentes (cfr. 3.2.1.5). En la Figura 3 se esquematiza el procedimiento de clonado empleado.

La inserción del cDNA de interés en los plásmidos de los clones que dan colonias blancas fue confirmada realizando una digestión enzimática con Not I (Fermentas), seguida de una electroforesis en gel de agarosa 1,5% para visualizar los productos de reacción.

Además, con el fin de obtener el DNA plasmídico en cantidad suficiente para poder ser secuenciado se prepararon cultivos de cada uno de estos clones y se realizó la extracción del mencionado material plasmídico (cfr. 3.2.1.7.1).

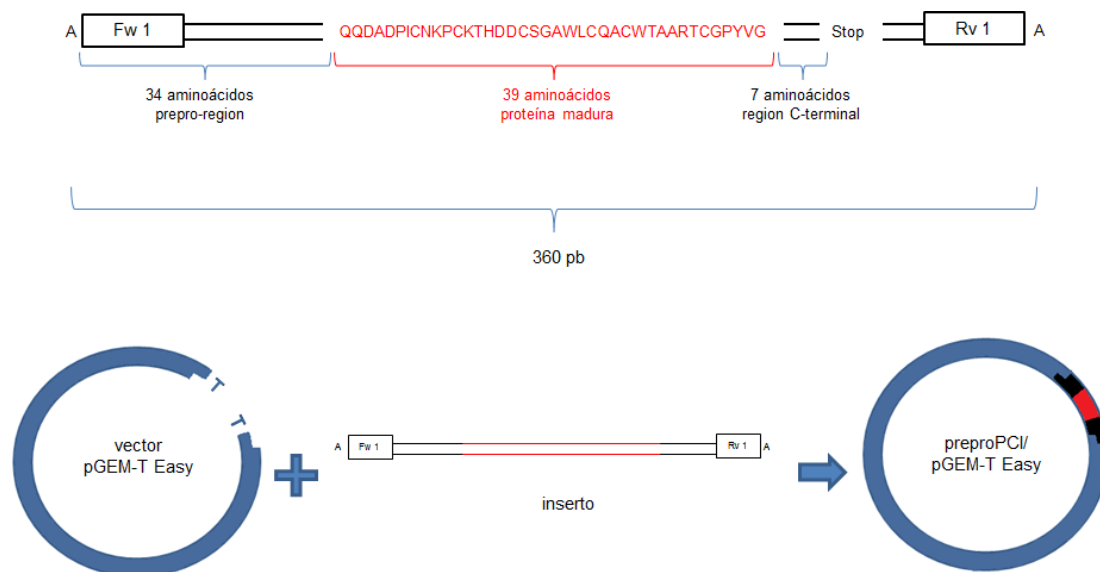


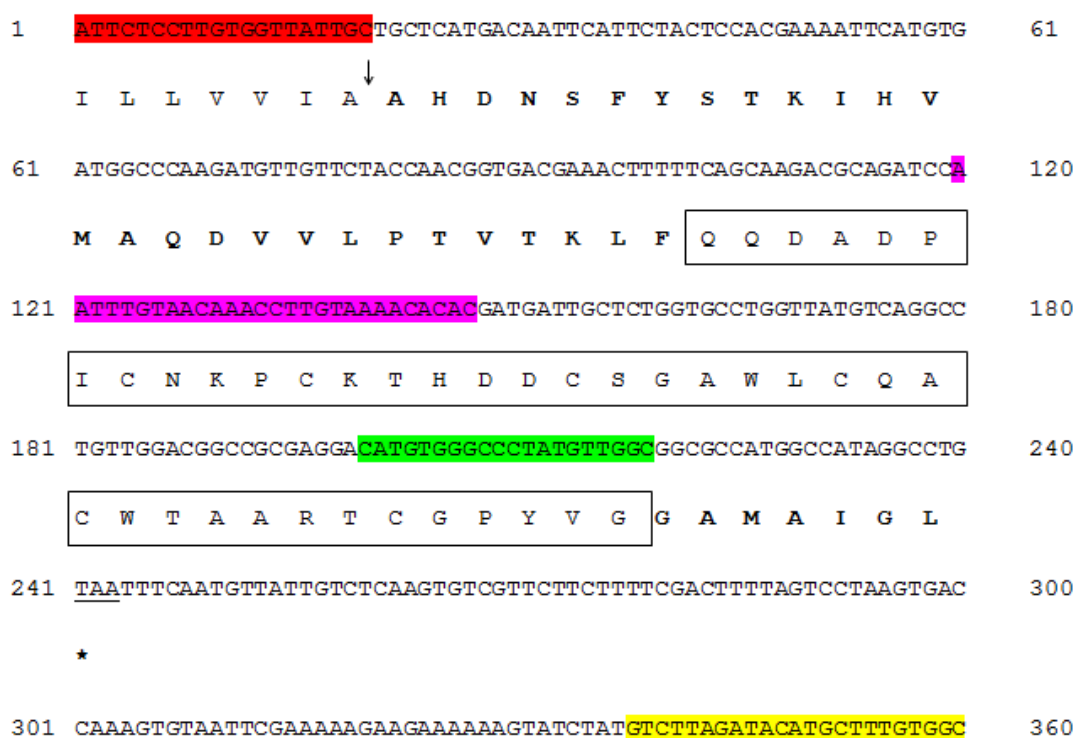
Figura 3: Esquema del inserto del cDNA de *Solanum tuberosum* especie *andigenum* variedad Imilla morada, purificado previamente a su incorporación en el vector pGEM-T Easy (Promega) e inserción del mismo en el vector para la obtención del plásmido.

4.1.3 Análisis de secuencia

La secuencia del cDNA fue obtenida utilizando *primers* específicos de los promotores T7 y SP6, ambos incluidos en el vector pGEM-T Easy. La misma fue analizada empleando el programa PSI-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>, Altschul et al., 1997), revelando elevado grado de identidad con secuencias de miembros pertenecientes a la familia de inhibidores de metalocarboxipeptidasas (base de datos MEROPS). El mayor porcentaje de identidad encontrado (98%) corresponde al inhibidor de metalocarboxipeptidasa de *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* (PCI_t, *accession number*: AF060551.1).

La secuencia consenso del cDNA clonado fue obtenida luego de analizar y procesar las secuencias de los clones mencionados en el punto anterior con el software de alineamiento Clustal-W. Para traducir la secuencia de nucleótidos a secuencia de aminoácidos se utilizó la herramienta de Internet del sitio <http://expasy.org/tools/dna.html>, que a partir de una secuencia de nucleótidos encuentra marcos de lectura en las 6 alternativas posibles y

La Figura 4 muestra la secuencia consenso del cDNA correspondiente a la secuencia parcial del preproPCl_a con su respectiva secuencia aminoacídica. Se muestra en rojo el sitio de hibridación del *primer* Fw1 y en amarillo el sitio de hibridación del *primer* Rv1, ambos utilizados en la fase de amplificación del clonado (cfr. 3.2.1.2.2.2). Además se marca en fucsia el sitio de hibridación del *primer* Fw2 y en verde el sitio del *primer* Rv2, cuyo diseño será explicado más adelante en la sección de expresión de la proteína. Se observa dentro del recuadro la secuencia correspondiente a la proteína madura y remarcados en negrita los residuos N- y C-terminal.



Tesina de Grado, Cotabarren J., 2014

4.1.3.1 Análisis de la secuencia nucleotídica

Adicionalmente, la secuencia nucleotídica obtenida para el preproPCI_a parcial fue comparada con la secuencia nucleotídica del preproPCI_t utilizando el servidor Clustal-W. El alineamiento obtenido se analizó con el programa Gene Doc y se marcaron tanto las mutaciones como las inserciones en el PCI_a respecto al PCI_t (Figura 5). En forma similar al esquema anterior, se muestra en rojo el sitio de hibridación para el primer Fw1 y en verde el sitio de hibridación para el primer Rv1 que, como era de esperar, al ser diseñados en base a esas secuencias, no presentan modificaciones en dichas bases.

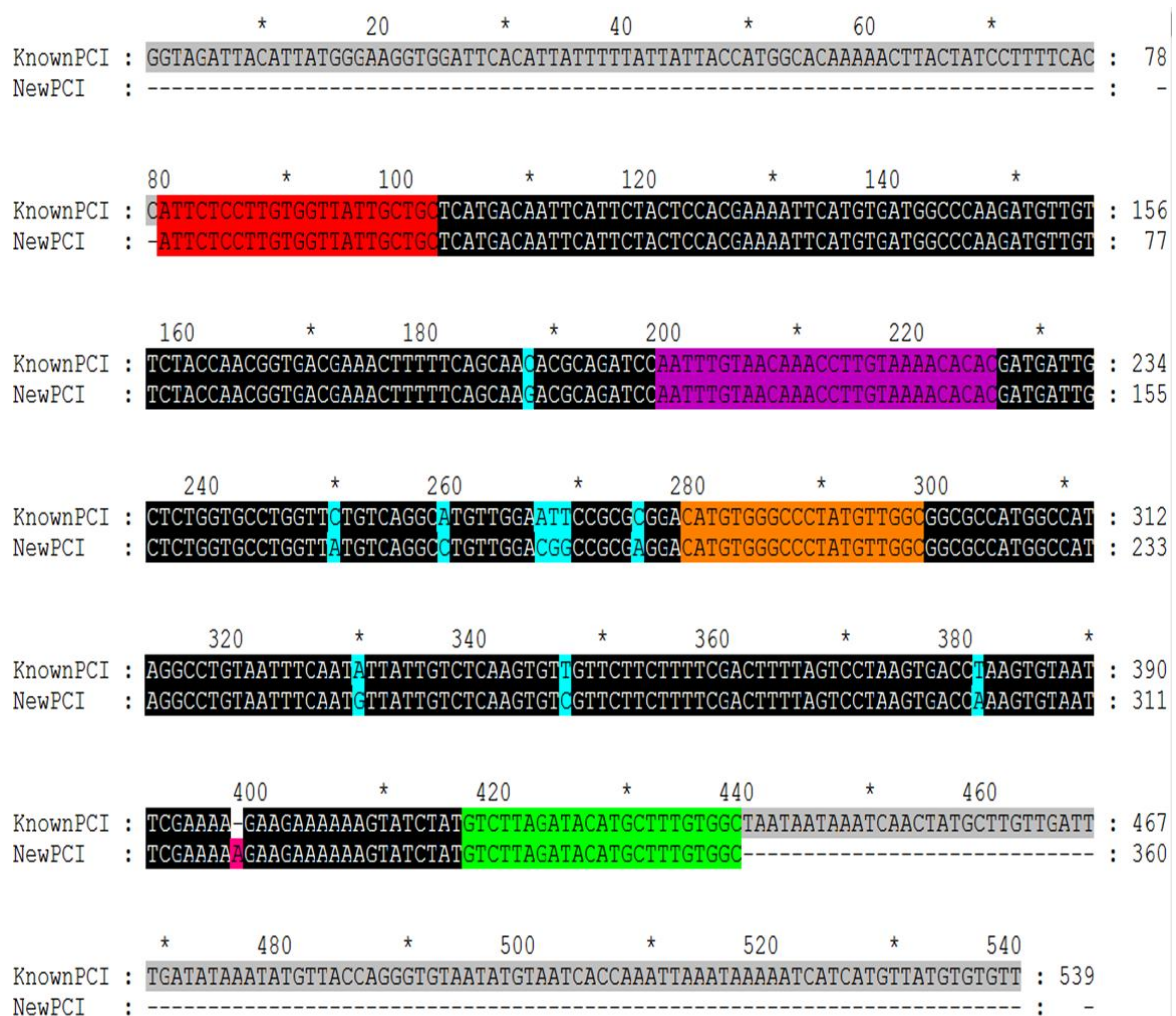
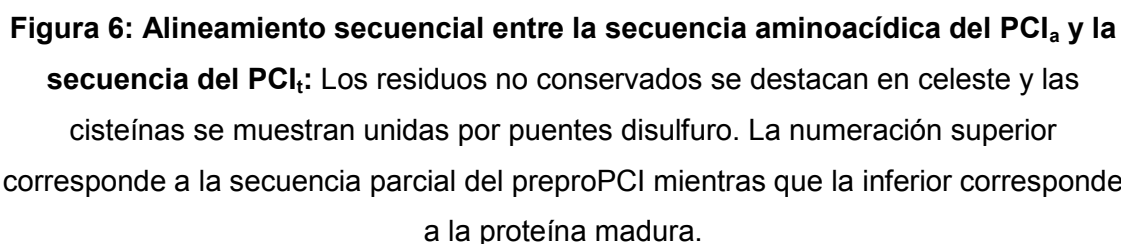


Figura 5: Alineamiento secuencial entre la secuencia nucleotídica del PCI_a y la secuencia del PCI_t. Los nucleótidos mutados en el preproPCI_a parcial se muestran resaltados en celeste, mientras que las inserciones se resaltaron en rosado.

4.1.3.2 Análisis de la secuencia aminoacídica

En la Figura 6 se destacan los aminoácidos no conservados entre ambas secuencias y se observan las cisteínas que forman parte de los puentes disulfuro. La numeración superior corresponde a la secuencia parcial del preproPCI mientras que la inferior corresponde a la proteína madura.



Si bien hay un alto porcentaje de similitud entre las secuencias proteicas del PCI_a y del PCI_t (89%), es importante destacar que las principales diferencias se encuentran localizadas en la región conocida como sitio secundario de unión (poner los aa). Dichas diferencias son especialmente interesantes, ya que esta región contribuye energéticamente con aproximadamente la mitad de la energía libre de disociación del complejo proteasa-inhibidor (Marino-Buslje, 2000). Esto aumenta el interés de la purificación del PCI_a para su caracterización en estudios comparativos con las moléculas ya estudiadas (ej. PCI_t) que, como mencionamos al principio de este trabajo, poseen importantes acciones terapéuticas en diversas patologías entre las cuales podemos citar a la malaria.

4.2. EXPRESIÓN DEL NUEVO PCI

4.2.1 Aislamiento del cDNA del PCI_a

Partiendo de la construcción de clonado pGEM-T Easy preproPCI_a parcial se procedió al aislamiento del cDNA que codifica para el nuevo PCI, realizando una PCR con los *primers* Fw2 y Rv2 (cfr.3.2.2.1). Estos *primers* se diseñaron a partir de la secuencia nucleotídica obtenida para el preproPCI_a parcial (cfr. 4.1.3.1), de manera tal que el *primer* Fw2 tuviese como sitio de hibridación a la región N-terminal de la proteína madura y un sitio de corte para la enzima de restricción BamH I; y el *primer* Rv2 fue diseñado en base a la región C-terminal de la proteína madura, añadiendo un codón stop y un sitio de corte para la enzima de restricción EcoR I (Tabla 1). De este modo, al realizar la amplificación con estos *primers*, fue posible la inserción de la secuencia codificante para la proteína madura del PCI_a en el vector de expresión PIN-III-OmpA3, para su posterior expresión.

En la tabla 1 se muestran los *primers* diseñados, resaltando la zona de hibridación e indicando sus propiedades más relevantes:

Mediante el empleo de los *primers* Fw2 y Rv2 se obtuvieron productos de tamaño esperado para el cDNA que codifica para el nuevo PCI de unos 100 pares de bases aproximadamente (33 residuos de aminoácidos).

PRIMERS	SECUENCIA (5'a 3')	PROPIEDADES DE LA ZONA QUE HIBRIDA		
		Tm	Long	%GC
Fw2	TCAGGGATCCAATTTGTAACAAACCTTGTAACACACAC BamHI	61,5	28 nt	29%
Rv2	GTCAGAATTCCTAGCCCAACATAGGGCCCACATG EcoRI Stop	61,5	28 nt	29%

Tabla 1: Primers diseñados a partir de las regiones N y C-terminal del nuevo PCI.

En gris se muestra la zona de hibridación de cada *primer*.

La Figura 7 corresponde a la electroforesis en agarosa 1,5% de los productos de PCR de la construcción de clonado pGEM-T_PCI_a.

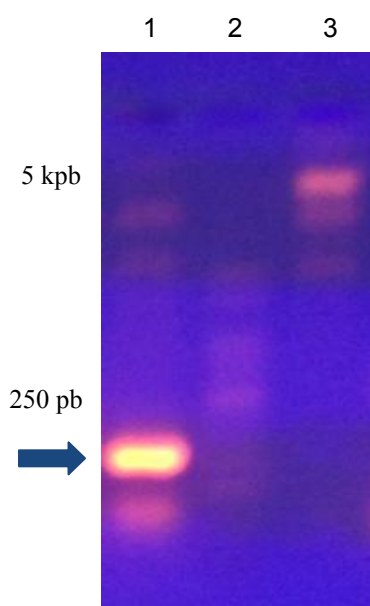


Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de PCR de la construcción de clonado PCI_a/pGEM-T, mediante empleo de *primers* Fw2 y Rv2. Calle 1: cDNA que codifica para el PCI_a. Calle 2: Patrón de peso molecular 50 pb. Calle 3: Patrón de peso molecular 1 kpb

El producto amplificado correspondiente a la secuencia del PCI_a flanqueada por los sitios de restricción para BamH I y EcoR I, fue purificado del gel de agarosa (cfr. 3.2.1.4) y ligado al vector de clonado pGEM-T Easy (cfr. 3.2.1.6.1) para su posterior transformación en *E. coli* XL1-Blue. Luego de la selección de clones recombinantes y el aislamiento del DNA plasmídico se procedió a liberar el fragmento de PCI_a del vector de clonado, por medio de una digestión doble con las enzimas de restricción BamH I y EcoR I. A continuación, el producto de aproximadamente 100 bp obtenido en dicha digestión fue purificado desde el gel de agarosa y ligado con T4 DNA Ligasa (Promega) al vector de expresión pIN-III-OmpA3, el cual fue sometido previamente a digestión doble con las mismas enzimas para liberar el

fragmento de PCI_t . Todos los productos de digestión se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 1,5 % para confirmar la obtención de los productos correctos en cada instancia del protocolo (cfr. 3.2.1.3).

En la Figura 8 se esquematizan los pasos seguidos para la obtención de la construcción de expresión. En la construcción inicial $pIN\text{-III-OmpA3_}PCI_t$ se resalta en gris la secuencia correspondiente al péptido señal y en amarillo la correspondiente al PCI_t , siendo ésta reemplazada luego de las digestiones dobles con posterior ligación, por la secuencia roja correspondiente al PCI_a .

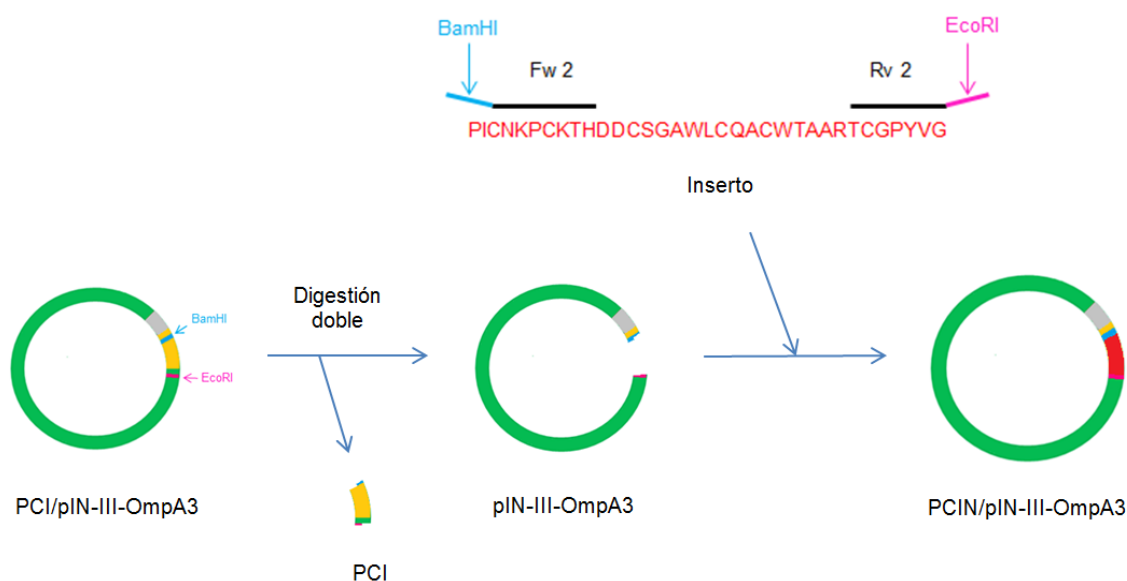


Figura 8: Esquema del inserto del cDNA de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum* variedad Imilla morada, previamente a su incorporación en el vector $pIN\text{-III-OmpA3}$. Se muestra la construcción inicial $pIN\text{-III-OmpA3_}PCI_t$, su digestión doble y la inserción del PCI_a .

El producto de ligación $pIN\text{-III-OmpA3_}PCI_a$ fue transformado en *E. coli* BL21 (DE3) para proceder a la producción de la proteína recombinante a partir de los clones seleccionados.

4.2.2 Expresión de la proteína recombinante

Para una posterior caracterización del nuevo PCI, se efectuó la expresión de la proteína recombinante. Para ello se seleccionó una de las colonias obtenidas previamente y se creció en medio mínimo de expresión BAT induciéndose la expresión de la proteína con IPTG (0,2 mM). Una vez transcurrido el tiempo de expresión, la proteína recombinante fue separada de los restos celulares mediante centrifugación por 20 min a 6000 rpm. El péptido señal OmpA3 incluido en el vector de expresión, es responsable de dirigir a la proteína en cuestión hacia el medio extracelular, por lo tanto, luego de la centrifugación se obtuvo el PCI_a en la fracción sobrenadante.

En la Figura 9 se muestra, a la izquierda, el crecimiento de *E. coli* BL21 transformada con la construcción PIN-III-OmpA3_PCI_a en medio mínimo BAT y a la derecha el sobrenadante producto de la centrifugación, una vez transcurridas las condiciones de expresión. En este sobrenadante se encuentra la proteína madura, que será objeto de posteriores pasos de purificación y caracterización.

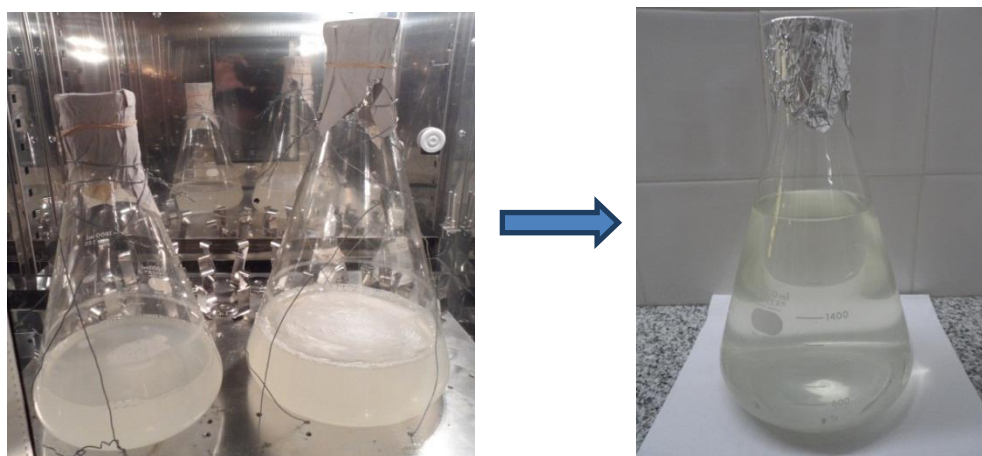


Figura 9: Expresión de la proteína recombinante PCI_a. A la izquierda se muestra el crecimiento de BL21 transformada con la construcción PIN-III-OmpA3_PCI_a en medio mínimo BAT. A la derecha se observa el sobrenadante producto de la centrifugación, una vez transcurridas las condiciones de expresión.

Una vez finalizada la colecta del sobrenadante se procedió al reordenamiento de los puentes disulfuro mediante agregado de cistina

(concentración final 2 mM) y cisteína (concentración final 4 mM), siguiendo la técnica descrita en cfr. 3.2.2.4.3. De este modo obtuvimos la proteína madura con los puentes disulfuro formados correctamente.

4.3. PURIFICACIÓN DEL NUEVO PCI

Cada paso de purificación fue monitoreado por HPLC con medidas de absorbancia a 280 nm, comenzando por el producto de expresión sometido a *reshuffling* (cfr. 3.2.2.4.3).

En la Figura 10 vemos que existe una pequeña fracción proteica que eluye con un tiempo de retención cercano a los 20 minutos, siendo éste un valor característico para el PCI ya estudiado (Villanueva J, 1998). Como método de control del seguimiento se realizó la misma cromatografía utilizando PCI_t recombinante como patrón. Por otro lado, se hizo un espectro de masas MALDI-TOF a la fracción eluída al tiempo de retención 20,5 minutos para verificar su presencia y finalmente, para confirmar su identidad, se determinó actividad inhibitoria de CPA (estos ensayos serán explicados en la sección de caracterización de la proteína recombinante). Observamos que el producto de expresión requiere múltiples pasos de purificación, ya que el espectro no está limpio sino que se observan fracciones eluídas a distintos tiempos de retención.

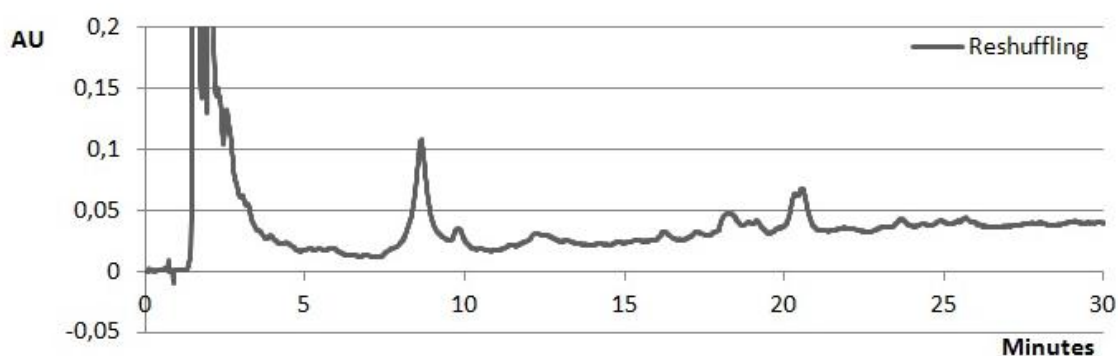


Figura 10: HPLC del producto de expresión sometido a reshuffling.

4.3.1 Cromatografía de intercambio iónico

En el primer paso de purificación de la muestra proveniente del *reshuffling* se realizó un cromatoenfoco desde pH 4 a pH 8,5 empleando una

columna de intercambio iónico que tiene una resina HST-Streamline, tal como se describió en cfr. 3.2.3.2. En dicha cromatografía se observan una fracción no retenida, pequeñas fracciones a lo largo del cromatograma y una gran fracción que eluye a pH 5. Esta última fracción fue sometida a HPLC para corroborar la presencia del inhibidor, tal como se describió en la sección anterior.

En la Figura 11 se muestra el HPLC de seguimiento de la cromatografía de intercambio iónico. Vemos que aumenta la fracción proteica que eluye con un tiempo de retención de 20,5 minutos, y a su vez se observa que disminuye la presencia de fracciones con tiempos de retención distintos al del inhibidor.

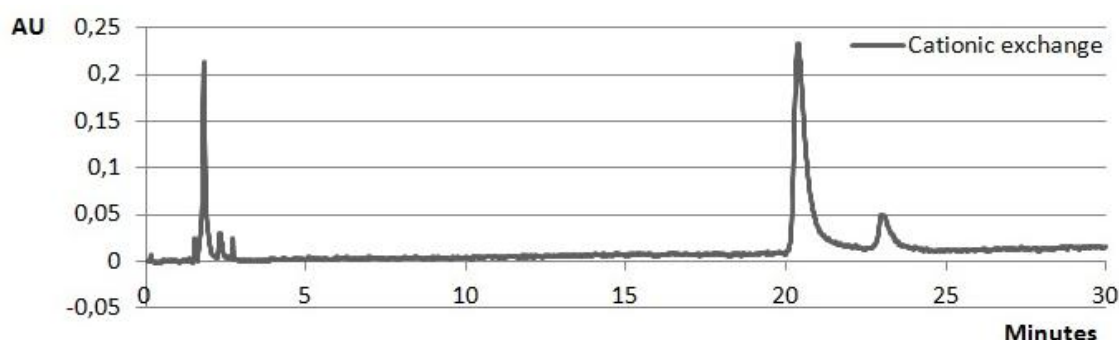


Figura 11: HPLC del producto de expresión sometido a intercambio iónico.

Estos resultados concuerdan con lo esperado debido a que el diseño de la expresión se realizó de manera tal que la proteína recombinante fuese dirigida al medio extracelular. De este modo, trabajamos sobre una muestra que contiene mayoritariamente al producto de expresión deseado por lo cual, con cada paso de purificación se acentúa su presencia en el tiempo de retención que lo caracteriza.

4.3.2 Cromatografía en fase reversa a presión normal

El siguiente paso de purificación se realizó empleando una resina de C18 (Sep-Paks C18, Waters) activada con 100% de acetonitrilo, continuando con el procedimiento descrito en cfr. 3.2.3.2. Una vez más se monitoreó la

purificación por HPLC con lecturas de absorbancia a 280 nm, observando en este caso la presencia de un gran pico a los 20,5 min de tiempo de retención y casi no se aprecian fracciones eluidas para otros tiempos de retención (Figura 12).

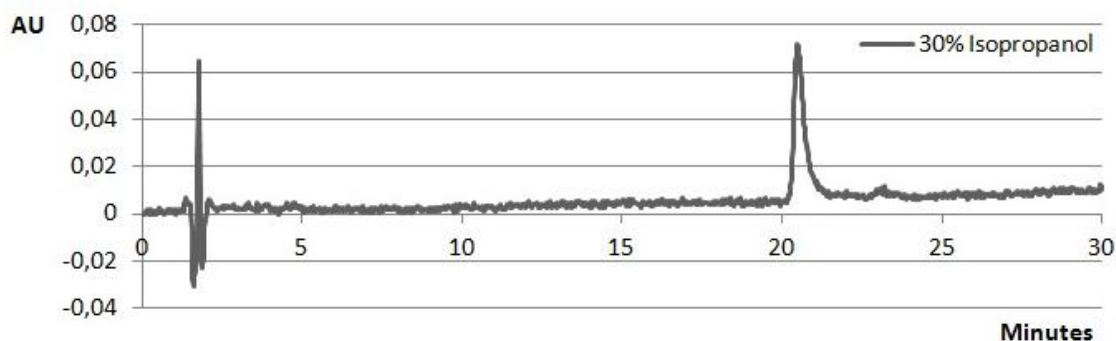


Figura 12: HPLC del producto de expresión sometido a cromatografía en fase reversa a presión normal.

4.4. CARACTERIZACIÓN DEL NUEVO PCI

4.4.1. Actividad inhibitoria de Carboxipeptidasa A

La actividad de carboxipeptidasa A (metallocarboxipeptidasa) se manifiesta por un aumento en la velocidad de desaparición del color naranja que posee el sustrato N-(4-metoxifenilazoformil)-Phe-OH (AFP), detectado a una longitud de onda de 350 nm, como resultado de su hidrólisis. Al incorporar la muestra del inhibidor purificado se determinó la actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A como la disminución en la velocidad de desaparición del color naranja en la mezcla de reacción, respecto a la obtenida en ausencia del inhibidor (control positivo de CPA)..

En la Figura 13 se observa que la presencia de PCI_a produce una disminución del 92 % en la actividad de carboxipeptidasa A, por lo cual confirmamos que la proteína expresada presenta actividad inhibitoria más allá de las diferencias encontradas en su secuencia respecto al PCI_t (cfr. 4.1.3.2).

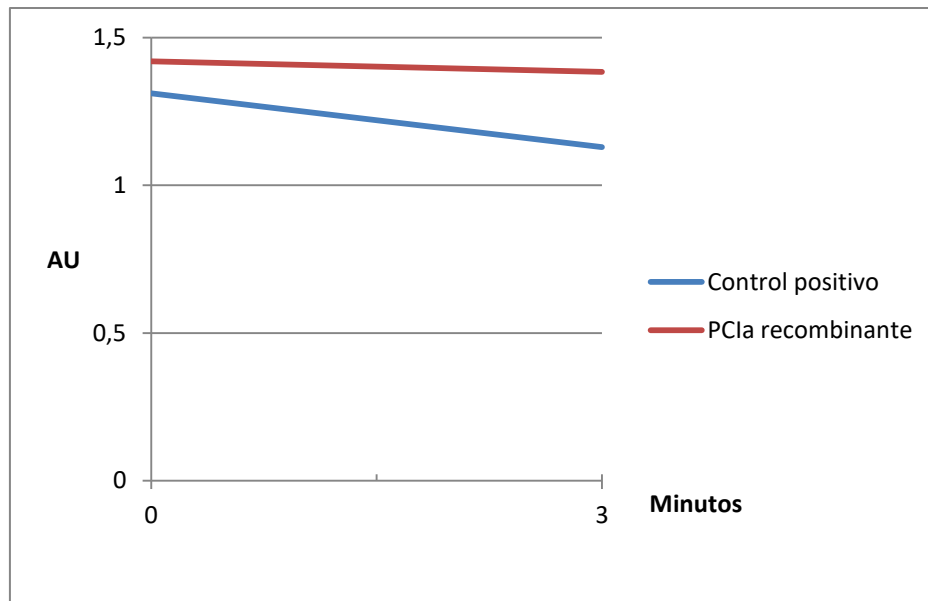


Figura 13: Medida de actividad inhibitoria de CPA por absorbancia a 350 nm.

4.4.2 Caracterización Proteómica

4.4.2.1 Determinación de pesos molecular por MALDI-TOF

El producto de expresión purificado fue analizado utilizando un espectrómetro de masas MALDI-TOF en el Laboratorio de Proteómica y Bioingeniería de Proteínas del Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBB) de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), España. La aplicación de esta técnica permite realizar el análisis del peso molecular del inhibidor con mayor resolución a la estimada por SDS-PAGE.

Como se aprecia en la Figura 14, el MALDI-TOF nos muestra un pico correspondiente a un peso molecular de 4237 Da, resultado que concuerda con el valor teórico (4234 Da) obtenido al analizar la secuencia aminoacídica estimada a partir del cDNA que codifica para el nuevo PCI (cfr. 4.1.3.2).

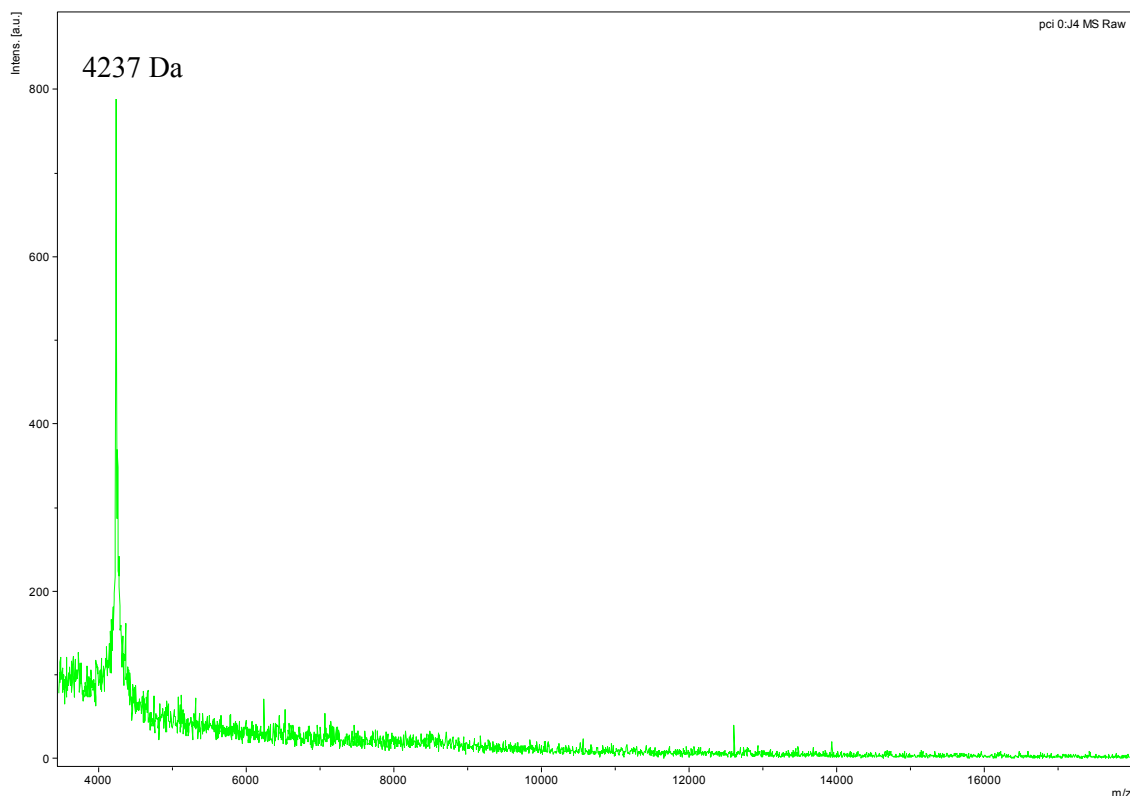


Figura 14: Análisis MALDI-TOF MS del producto de expresión purificado.

4.4.2.2. PMF MALDI-TOF

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE del producto de expresión purificado, obteniéndose una banda de bajo peso molecular, lo cual concuerda con el peso esperado para el inhibidor.

Para realizar un estudio de identificación, la banda fue cortada y sometida a digestión trípica. Luego de la digestión se procedió a analizar los péptidos generados mediante espectrometría de masas y obtener la huella peptídica para compararla con la base de datos MASCOT de acuerdo a lo explicado en cfr. 3.2.4.2.2.

El análisis de la huella peptídica utilizando la base de datos mencionada no pudo determinar la identidad del inhibidor encontrado, por lo cual se confirmaría que se trata de un nuevo inhibidor, no estudiado hasta el momento (Figura 15.).

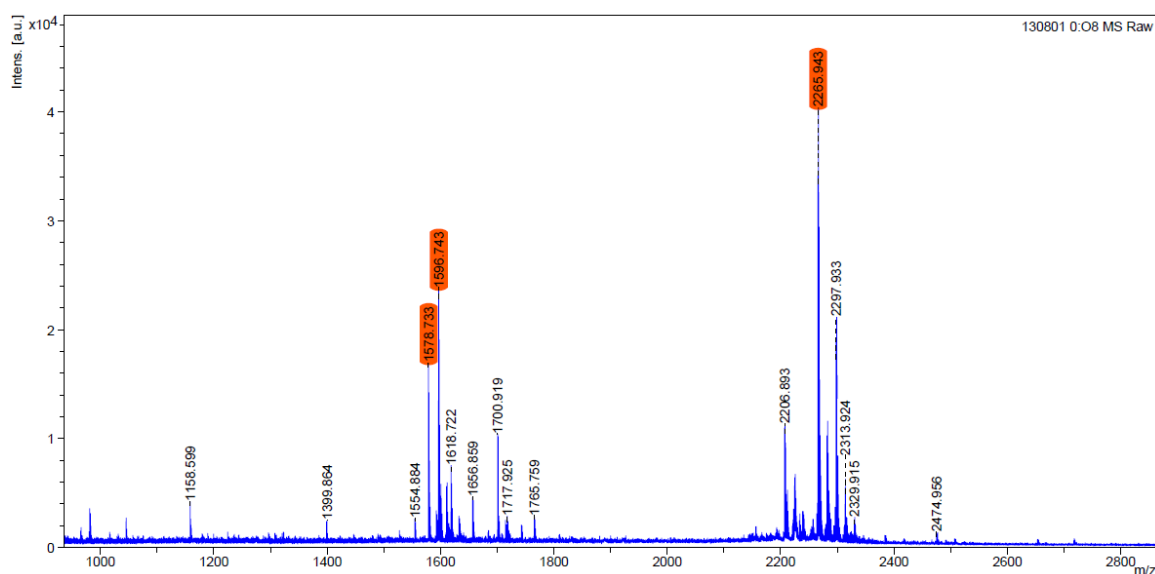


Figura 15: Espectro de masas obtenido luego de la digestión trípica del producto de expresión purificado.

4.4.2.3 PMF MALDI-TOF/TOF

En el último paso de caracterización se procedió al análisis de los espectros de fragmentación. De esta manera, los péptidos con m/z 1578,7 Da, 1596,7 Da y 2265,9 Da. fueron seleccionados por el *timed-ion-selector* y analizados por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF de acuerdo a lo descrito en cfr. 3.2.4.2.3.

Dicho análisis sólo permitió determinar una secuencia de 13 residuos de aminoácidos que identifican al nuevo inhibidor de CPA en el péptido con m/z 1596,7 Da (Figura 16). La secuencia (EQHADPICNKPKCK) corresponde parcialmente a la secuencia del inhibidor de CPA (PCI_I) depositada en la base de datos MEROPS.

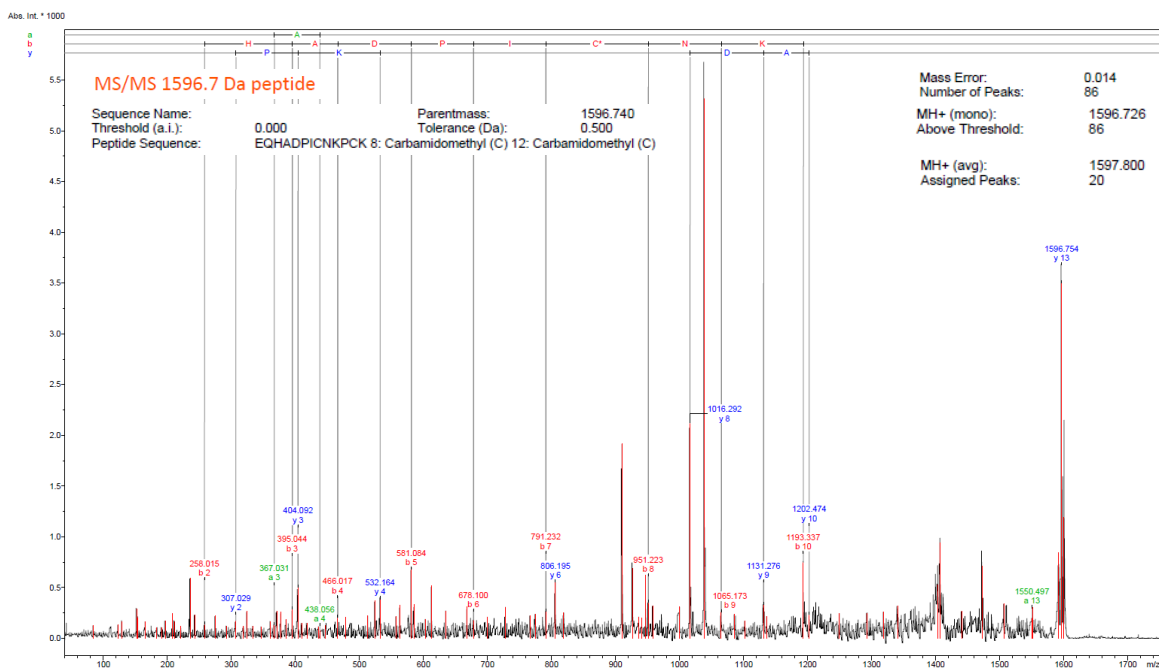


Figura 16: PMF MALDI-TOF/TOF del péptido fragmentado de m/z 1596,7 Da.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró aislar un nuevo inhibidor de carboxipeptidasa A (CPA) de papa andina al que hemos denominado PCI_a . La naturaleza del inhibidor es peptídica y dicha molécula fue clonada, expresada y caracterizada bioquímicamente. PCI_a posee un elevado grado de conservación de residuos aminoácidos en toda la secuencia, respecto al ya conocido y estudiado inhibidor de carboxipeptidasa A proveniente de papa común, al que hemos llamado PCI_t . En la secuencia aminoácida teórica de la molécula clonada se observa la típica organización de los inhibidores de metalocarboxipeptidasa, que consiste en una región N-terminal de propéptido formada por 27 aminoácidos, seguida de 39 residuos correspondientes a la proteína madura y una extensión de 7 residuos C-terminales. Más aún, encontramos conservadas las seis cisteínas involucradas en la formación de puentes disulfuro (Cys8-Cys12; Cys24-Cys27 y Cys18-Cys34). Si bien hay un alto porcentaje de similitud entre ambas secuencias proteicas (89%), PCI_a y PCI_t , es importante destacar que las principales diferencias se encuentran localizadas en la región conocida como sitio secundario de unión. Dichas variaciones son especialmente interesantes, ya que esta región contribuye energéticamente con aproximadamente la mitad de la energía libre de disociación del complejo proteasa-inhibidor. Esto hace que sea interesante su purificación y caracterización para el estudio de comparación de dicha molécula con el PCI_t .

Por otro lado, mediante estrategias de biología molecular se logró subclonar el cDNA del PCI_a en un vector adecuado para su posterior expresión como proteína recombinante en una cepa de *E. coli*. El PCI_a recombinante obtenido fue caracterizado por cinética de inhibición y técnicas proteómicas. La caracterización por actividad inhibitoria de CPA nos muestra que el producto de expresión produce una disminución del 92 % en la actividad de CPA, por lo tanto se trata de una molécula inhibitoria funcional. Por análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF corroboramos la presencia de un pico correspondiente a un peso molecular de 4237 Da, resultado que concuerda con el valor teórico (4234 Da) obtenido al analizar la secuencia aminoácida

estimada a partir del cDNA clonado que codifica para el nuevo PCI. El análisis de la huella peptídica utilizando la base de datos MEROPS no pudo determinar la identidad del inhibidor encontrado, por lo cual se confirmaría que se trata de un nuevo inhibidor, no estudiado hasta el momento. Finalmente, logramos secuenciar por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF un péptido interno de 13 residuos de aminoácidos que corresponde parcialmente a la secuencia del inhibidor de CPA (PCI_t) depositada en la base de datos.

Así, todos los ensayos realizados son consistentes con la obtención de una molécula recombinante inhibitoria de CPA, similar al PCI_t, cuyas propiedades teóricas predichas se corresponden con las obtenidas experimentalmente.

PERSPECTIVAS A FUTURO

Con toda esta información brindada resulta de sumo interés implementar y refinar estrategias de búsqueda masiva de moduladores/inhibidores de proteasas en extractos vegetales. Con este fin se propuso clonar, expresar, aislar y caracterizar inhibidores de proteasas que serán analizados frente a proteasas blanco de patologías específicas para su posterior aplicabilidad en el área del desarrollo de nuevos fármacos, contribuyendo significativamente al conocimiento bioquímico y biológico de las especies estudiadas.

En lo que respecta al inhibidor de carboxipeptidasa de papa aislado a partir de *S. tuberosum* ssp *andigenum* var. Imilla morada sería interesante estudiar las implicancias que poseen las diferencias observadas respecto al PCI_t , sea en el mecanismo de acción como en la actividad inhibitoria de CPA. En particular, aquellas diferencias que encontramos en el sitio secundario de unión a la proteasa, y en caso de obtener resultados satisfactorios, estudiar su aplicabilidad como potencial agente terapéutico.

BIBLIOGRAFÍA

- Ottaviani, J. I., Actis-Goretti, L., Villordo, J. J., & Fraga, C. G. (2005). Procyanidin structure defines the extent and specificity of angiotensin I converting enzyme inhibition. *Biochimie* 88, 359–365.
- Wood, J. M., Maibaum, J., Rahuel, J., Grutter, M. G., Cohen, N. C., Rasetti, V. (2003). Structure-based design of aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 308, 698–705.
- Arribas, J. R., Pulido, F., Delgado, R., Lorenzo, A., Miralles, P., Arranz, A. (2005). Lopinavir/ritonavir as single-drug therapy for maintenance of HIV-1 viral suppression: 48-week results of a randomized, controlled, open-label, proof-of-concept pilot clinical trial (OK Study). *J Acquir Immune Defic Syndr* 40, 280–287.
- Turk, V., J. Kos And B. Turk (2004) "Cysteine cathepsins (proteases)—On the main stage of cancer?", *Cancer Cell*, 5: 409–410 (review). *Cancer Cell* 5: 409–20
- Lamarre, D., Anderson, P. C., Bailey, M., Beaulieu, P., Bolger, G., Bonneau, P. (2003). An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* 426, 186–189.
- Binford, S. L., Maldonado, F., Brothers, M. A., Weady, P. T., Zalman, L. S., Meador, J. W. (2005). Conservation of amino acids in human rhinovirus 3C protease correlates with broad-spectrum antiviral activity of rupintrivir, a novel human rhinovirus 3C protease inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 619–626.
- Malcolm, B. A., Liu, R., Lahser, F., Agrawal, S., Belanger, B., Butkiewicz, N. (2006). SCH 503034, a mechanism-based inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease, suppresses polyprotein maturation and enhances the antiviral activity of alpha interferon in replicon cells. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 1013–1020.
- UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA. *Agentes terapéuticos para el tratamiento de la malaria*. Universidad Complutense de Madrid. España. WO 2008/077977. 03-07-2008.
- Fear, G. Komarnytsky, S. & Raskin, I. *Pharmacology & Therapeutics* 113, (2007).
- Brzin, J. & Kidric, M. (1995) "Proteinases and their inhibitors in plants: role in normal growth and in response to various stress conditions". *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 13: 420–67

- Ryan, C.A. (1990) "Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens" *Annu.Rev.Phytopath.* 28: 425-49.
- Valueva, T.A. & V.V. Mosolov (1999) "Protein inhibitors of proteinases in seeds: I. Classification, distribution, structure, and properties" *Russian J. Plant Physiol.* 46: 362-78.
- Ottaviani, J. I., Actis-Goretti, L., Villordo, J. J., & Fraga, C. G. (2005). Procyanidin structure defines the extent and specificity of angiotensin I converting enzyme inhibition. *Biochimie* 88, 359–365.
- Wood, J. M., Maibaum, J., Rahuel, J., Grutter, M. G., Cohen, N. C., Rasetti, V.(2003). Structure-based design of aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 308, 698–705.
- Arribas, J. R., Pulido, F., Delgado, R., Lorenzo, A., Miralles, P., Arranz, A.(2005). Lopinavir/ritonavir as single-drug therapy for maintenance of HIV-1viral suppression: 48-week results of a randomized, controlled, open-label, proof-of-concept pilot clinical trial (OK Study). *J Acquir Immune Defic Syndr* 40, 280–287.
- Turk, V., J. Kos And B. Turk (2004) "Cysteine cathepsins (proteases)—On the main stage of cancer?", *Cancer Cell*, 5: 409-410 (review). *Cancer Cell* 5: 409-20.
- Lamarre, D., Anderson, P. C., Bailey, M., Beaulieu, P., Bolger, G., Bonneau, P. (2003). An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* 426, 186–189.
- Binford, S. L., Maldonado, F., Brothers, M. A., Weady, P. T., Zalman, L. S., Meador, J. W. (2005). Conservation of amino acids in human rhinovirus 3C protease correlates with broad-spectrum antiviral activity of rupintrivir, a novel human rhinovirus 3C protease inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 619–626.
- ¹Malcolm, B. A., Liu, R., Lahser, F., Agrawal, S., Belanger, B., Butkiewicz, N. (2006). SCH 503034, a mechanism-based inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease, suppresses polyprotein maturation and enhances the antiviral activity of alpha interferon in replicon cells. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 1013–1020.
- Brown, S., Meroueh, S. O., Fridman, R., & Mobashery, S. (2004). Quest for selectivity in inhibition of matrix metalloproteinases. *Curr Top Med Chem* 4, 1227–1238.
- Jedinak, A., & Maliar, T. (2005). Inhibitors of proteases as anticancer drugs. *Neoplasma* 52, 185–192..

- Yan, S., M. Sameni & B.F. Sloane (1998) "Cathepsin B and human tumor progression", *Biol. Chem.* 379: 113-23
- Fujita, M., Nakao, Y., Matsunaga, S., van Soest, R. W. M., Itoh, Y., Seiki, M. (2003). Callysponginol sulfate A, an MT1-MMP inhibitor isolated from the marine sponge *Callyspongia truncata*. *J Nat Prod* 66, 569–571.
- Overall, C. M., & Kleifeld, O. (2006). Tumour microenvironment- opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 6, 227–239.
- Becker, M.M., S.A. Harrop, J.P. Dalton, B.H. Kalinna, D.P. McManus & P.J. Brindley (1995) "Cloning and characterization of the *Schistosoma japonicum* aspartic proteinase involved in hemoglobin degradation" *J. Biol. Chem.* 270: 24496-501
- Brindley, P.J., B.H. Kalinna, J.P. Dalton, S.R. Day, J.W. Wong, M.L. Smythe & D.P. McManus (1997) "Protolytic degradation of host hemoglobin by schistosomes" *Mol. Biochem. Parasitol.* 89: 1-9
- Silva, A.M., A.Y. Lee, S.V. Guinik, P. Maier, J. Collins, T.N. Bhat, P.J. Collins, R.E Cachau, K.E. Luker, I.Y. Gluzman, S.E. Francis, A. Oksman, D.E. Goldberg & J.W. Ericson (1996) "Structure and inhibition of plasmepsin II, a hemoglobin-degrading enzyme from *Plasmodium falciparum*", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 10034-9
- Li, Z.; X. Chen, E. Davidson, O. Zwang, C.S. Mendis, W.R. Roush, G. Fegley, R. Li & P.J. Rosenthal (1994) "Antimalarial drug development using models of enzyme structure", *Chem. Biol.* 1: 31-7
- Ersmark, K., Samuelsson, B., & Hallberg, A. (2006). Plasmepsins as potencial targets for new antimalarial therapy. *Med Res Rev* 26, 626–666.
- Abad-Zapatero, C., R. Goldman, S.W. Muchmore, C. Hutchins, T. Ole, K. Stewart, S.M. Cutfield, J.F. Cutfield, S.I. Founding & T.L. Ray (1998) "Structure of secreted aspartic proteinases from *Candida*- Implications for the design of antifungal agents", *Adv. Med. Biol.* 436: 297-313.
- Bectic, J., Lell, C. P., Fuchs, A., Stoiber, H., Speth, C., Lass-Florl, C. (2001). HIV protease inhibitors attenuate adherence of *Candida albicans* to epithelial cells in vitro. *FEMS Immunol Med Microbiol* 31, 65–71.
- Patick, A. K., & Potts, K. E. (1998). Protease inhibitors as antiviral agents. *Clin Microbiol Rev* 11, 614–627.
- Lin K., A.D. Kwong & C. Lin (2004) "Combination of a hepatitis C virus NS3-NS4A protease inhibitor and alpha interferon synergistically inhibits viral RNA replication and facilitates viral RNA clearance in replicon cells" *Antimicrob Agents Chemother* 48:4784-92

- De Clercq E. (2004) "Antiviral drugs in current clinical use", *J Clin Virol.* 30:115-33
- Bilfinger, T. V., & Stefano, G. B. (2002). The role of protease inhibition with emphasis on the effects of inflammation and vascular immune phenomena. *Curr Pharm Des* 8, 505–509.
- Bilfinger, T. V., & Stefano, G. B. (2002). The role of protease inhibition with emphasis on the effects of inflammation and vascular immune phenomena. *Curr Pharm Des* 8, 505–509.
- Bernstein P.R., P.D. Edwards & J.C. Williams (1994) "Inhibitors of human leukocyte elastase", *Prog Med Chem.* 31:59-120
- Hugli T.E. (1996) "Protease inhibitors: novel therapeutic application and development", *Trends Biotechnol.* 14:409-12
- Cataldo D.D., M.M. Gueders, N. Rocks, N.E. Sounni, B. Evrard, P. Bartsch, R. Louis, A. Noel & J.M. Foidart (2003) "Pathogenic role of matrix metalloproteases and their inhibitors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease and therapeutic relevance of matrix metalloproteases inhibitors", *Cell Mol Biol* 49:875-84.
- Boos C.J. & G.Y. Lip (2004) "Novel therapies for the prevention of stroke", *Expert Opin Investig Drugs.* 13:1615-30.
- Gladwell, T. D. (2002). Bivalirudin: a direct thrombin inhibitor. *Clin Ther* 24,38–58.
- Eriksson, B. I., & Quinlan, D. J. (2006). Oral anticoagulants in development: focus on thromboprophylaxis in patients undergoing orthopaedic surgery. *Drugs* 66, 1141–1429.
- Vassar R., B.D. Bennett, S. Babu-Khan, S. Kahn, E.A. Mendiaz, P. Denis, D.B. Teplow, S. Ross, P. Amarante, R. Loeloff, Y. Luo, S. Fisher, J. Fuller, S. Edenson, J. Lile, M.A. Jarosinski, A.L. Biere, E. Curran, T. Burgess, J.C. Louis, F. Collins, J. Treanor, G. Rogers & M. Citron (1999) "Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE", *Sciencet* 22:735-41.
- Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science.* 281: 1312-6.
- Hass, G.M. and Derr, J.E. (1979) Purification and Characterization of the Carboxypeptidase Isoinhibitors from Potatoes, *Plant Physiol*, 64, 1022-1028
- Hass, G.M. and Ryan, C.A. (1981) Carboxypeptidase inhibitor from potatoes. *Methods in Enzymology*, 80: 778-91.

- Nagase, H. (1996) in Zinc Metalloproteases in Health and Disease, pp. 153-204. (Hooper, N.M., ed.), Taylor and Francis, London.
- Oliva, M. L., Souza-Pinto, J. C., Batista, I. F., Araujo, M. S., Silveira, V. F., Auerswald, E. A. (2000). *Leucaena leucocephala* serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema. *Biochim Biophys Acta* 1477: 64–74.
- Kennedy, A. R., & Wan, X. S. (2002). Effects of the Bowman-Birk inhibitor on growth, invasion, and clonogenic survival of human prostate epithelial cells and prostate cancer cells. *Prostate*. 50: 125–133.
- Chen, Y. W., Huang, S. C., Lin-Shiau, S. Y., & Lin, J. K. (2005). Bowman-Birk inhibitor abates proteasome function and suppresses the proliferation of MCF7 breast cancer cells through accumulation of MAP kinase phosphatase-1. *Carcinogenesis*. 26:1296–1306.
- Hopkins, A. L. & Groom, C. R. *The druggable genome. Nat Rev Drug Discov* 1, 727-30 (2002)
- Villanueva J., Canals F., Prat S., Ludevid D., Querol E., Avilés F. X. (1998) Characterization of the wound-induced metallocarboxypeptidase inhibitor from potato. *FEBS* 440: 175-182.
- Ghrayeb J., Kimura H., Takahara M., Hsiung H., Masui Y., Inouye M. (1984) Secretion cloning vectors in escherichia coli. *EMBO* vol.3. 10: 2437-2442.
- Arolas J.L., Castillo V., Bronsoms S., Aviles F.X., Ventura S. (2009) Designing Out Disulfide Bonds of Leech Carboxypeptidase Inhibitor: Implications for Its Folding, Stability and Function. *J. Mol. Biol.* 392, 529–546
- Villanueva J., Canals F., Prat S., Ludevid D., Querol E., Avileès F.X. (1998) Characterization of the wound-induced metallocarboxypeptidase inhibitor from potato cDNA sequence, induction of gene expression, subcellular immunolocalization and potential roles of the C-terminal propeptide *FEBS Letters* 440 175-182
- Aviles F.X., Vendrell J., Guasch A., Coll M., Huber R. (1993) Advances in metallo-procar boxypeptidases Emerging details on the inhibition mechanism and on the activation process. *Eur. J. Biochem.* 211, 381 -389
- Molina M.A., Marino C., Oliva B., Aviles F.X., Queroll E. (1994). C-tail Valine Is a Key Residue for Stabilization of Complex between Potato Inhibitor and Carboxypeptidase A *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 269, No. 34, Issue of August 26, pp. 21467-21472

Chang J., Canals F., Schindler P., Querol E., Aviles F.X. (1994). The Disulfide Folding Pathway of Potato Carboxypeptidase Inhibitor The Journal of Biological Chemistry Vol. 269, No. 35, Issue of September 2, pp. 22087-22094

Nielsen H., Engelbrecht J., Brunak S. von Heijne G.(1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites Protein Engineering vol.10 no.1 pp.1–6,

Hass G.M., Derr J.E., Makus D.J., Ryan C.A. (1979) Purification and Characterization of the Carboxypeptidase Isoinhibitors from Potatoes Plant Physiol. 64, 1022-1028

Quilis J., Meynard D., Vila L., Avilés F.X., Guiderdoni E., San Segundo B. (2007) A potato carboxypeptidase inhibitor gene provides pathogen resistance in transgenic rice *Plant Biotechnology Journal* 5 , pp. 537–553

Wang X., Smith P. L., Hsu M. -Y., Ogletree M. L. Schumacher W. A. (2006). Murine model of ferric chloride-induced vena cava thrombosis: evidence for effect of potato carboxypeptidase inhibitor. *J Thromb Haemost*; 4: 403–10.

Clarence A., Ryan G., Hass M., Kuhn R.W.. (1974) Purification and Properties of a Carboxypeptidase Inhibitor from Potatoes. *THE Jourmar. of Biological Chemistry* Vol. 249, No. 17, pp. 5495-5499,

Martínez A., Moreno V., Sanglas L., de Llorens R., Avilés F.X., Lorenzo J. (2008). Study by HPLC-MS of the interaction of platinum antitumor complexes with potato carboxypeptidase inhibitor (PCI). *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16 6832–6840